

Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del grado académico de **Doctor en Ciencias Biológicas.**

“Caracterización molecular de fagos argentinos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y obtención de mutantes fagorresistentes para aplicaciones industriales”

Tesista: Bioquímica Daniela M. Guglielmotti

Director: Dra. Andrea Quiberoni

Co-Director: Dr. Jorge A. Reinheimer

**Instituto de Lactología Industrial
Facultad de Ingeniería Química**

Santa Fe, Diciembre de 2006.

Agradezco profundamente:

-Al Ing. Carlos Zalazar, Director del INLAIN, por su constante buena predisposición.

-A la Dra. Andrea Quiberoni, Directora de esta Tesis y casi una segunda madre (a pesar de su juventud), que desde el primer momento me hizo sentir cómoda, y a quien le debo todo lo que aprendí. Gracias por estar siempre "ahí" cuando necesité una mano, por la humildad, por transmitir grandes conocimientos con pequeñas palabras, por alentarme siempre a seguir adelante.

-Al Dr. Jorge Reinheimer, Co-Director de esta Tesis y mi puerta de entrada en el maravilloso mundo de la microbiología de lácteos. Gracias por tener siempre esa infinita paciencia, por compartir con humildad sus conocimientos y, sobre todo, por haberme dado la posibilidad de trabajar en su grupo de trabajo.

-A los amigos que conocí en el INLAIN, Diego, Emilio, Nato, Mariana, algunos de los cuales todavía están y otros han tomado nuevos rumbos, pero la amistad perdura. A Manqui, una "pequeña" gran persona, gracias por la enorme colaboración.

-A Luján, Viv y Mario, que me han aguantado a lo largo de todos estos años. Al resto de mis compañeros, Patri, Ana, Gabriel, Cari, Merce, Laura, Vero, Belén, Cristina, Palmi, por la buena onda.

-A los Dott. Giorgio Giraffa y Domenico Carminati (ILC, Lodi, Italia), por su excelente predisposición y paciencia durante mi estadía en Lodi. A mis compañeros del ILC, Laura, Maria Chiara, Lucia, Antonio, Cristina, Manu, Barbara, Miriam, Lara, por su gran ayuda y compañía.

-Al Dr. C. G. Vinderola y al grupo del CERELA (Tucumán), por su colaboración.

-A mis compañeros del CIDCA (La Plata), Fernanda, Judith, Fernando, Pablo, por hacerme sentir sumamente cómoda, y especialmente a Marina, por su tiempo e inmensa ayuda. A las Dras. Graciela De Antoni y Analía Abraham, por su amabilidad y buena predisposición.

-A mis amigos de la vida, Pachu y Chucho, Yami, Gra, Costi, Sebi, Colo, Fede, Fer, Andru, Panchi, por estar.

-A mis viejos y mi hermana, pilares fundamentales de mi vida.

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

Titulares:

- Dra. Graciela L. De Antoni (UNLP)
- Dra. Graciela Savoy de Giori (CERELA – CONICET)
- Dr. Juan Carlos Basílico (UNL)

Suplente:

- Ing. Carlos Meinardi (UNL)
-

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis fueron parcialmente difundidos a través de las siguientes publicaciones:

- ✓ "Characterization of three *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages and the physicochemical analysis of phage adsorption" (2004). Quiberoni, A.; Guglielmotti, D.; Binetti, A. y Reinheimer, J. *Journal of Applied Microbiology* 96, 340-351.
 - ✓ "Characterization of spontaneous phage-resistance derivatives of *Lactobacillus delbrueckii* commercial strains" (2006). Guglielmotti, D. M.; Reinheimer, J. A.; Binetti, A. G.; Giraffa, G.; Carminati, D. y Quiberoni, A. *International Journal of Food Microbiology* 111, 126-133.
 - ✓ "Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants" (2006). Guglielmotti, D. M., Briggiler Marcó, M., Golowczyc, M., Reinheimer, J. A. and Quiberoni, A. del L. *International Dairy Journal* (en prensa).
 - ✓ "The isolation of phage resistant derivatives of *Lactobacillus delbrueckii* strains may change their functional properties" (2006). Vinderola, G.; Briggiler Marcó, M.; Guglielmotti, D.; Perdigón, G.; Reinheimer, J. y Quiberoni, A. *International Journal of Food Microbiology* (aceptado).
-

INDICE

RESUMEN 1

ABSTRACT 5

INTRODUCCIÓN 8

I. LAS BACTERIAS LÁCTICAS 8

 I.1. Las bacterias lácticas en la industria láctea fermentativa..... 10

 I.1.1. Fermentación de azúcares. Desarrollo de acidez..... 13

 I.1.2. Desarrollo de compuestos de flavor..... 13

 I.1.3. Síntesis de compuestos que influyen en la textura del producto 15

 I.1.4. Producción de compuestos antimicrobianos 16

 I.2. Bacterias lácticas termófilas en la industria láctea fermentativa. 19

 Rol de *Lb. delbrueckii* 19

II. POTENCIALIDAD PROBIÓTICA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS 20

 II.1. Criterios de selección de microorganismos probióticos 20

 II.2. Rol probiótico de *Lb. delbrueckii*..... 29

III. LOS BACTERIOFAGOS..... 33

 III.1. Fagos de bacterias lácticas 33

 III.2. Ciclo vital de un fago 36

 III.2.1. Ciclo lítico 37

 III.2.2. Ciclo lisogénico..... 38

 III.4. Mecanismos de fagoresistencia 39

 III.4.1. Bloqueo de la adsorción..... 40

 III.4.2. Bloqueo de la inyección del ADN fágico 41

 III.4.3. Restricción-Modificación (R/M) 42

 III.4.4. Infección Abortiva (Abi) 43

 III.4.5. Inmunidad lisogénica 44

 III.4.6. Mecanismos de resistencia diseñados por ingeniería genética 46

 III.5. Estrategias para el control de los bacteriofagos 47

 III.5.1. Problemática de la infección fágica en la industria láctea 47

 III.5.2. Medios inhibidores de fagos..... 48

 III.5.3. Tratamientos térmicos..... 49

III.5.4. Tratamientos químicos. Limpieza y desinfección del ambiente industrial	50
III.5.5. Cultivos de inoculación directa.....	51
III.5.6. Cultivos monocepa, multicepa y rotación de cultivos	52
III.5.7. Obtención de cepas con resistencia fágica mejorada	53
OBJETIVOS.....	59
MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
I. CEPAS BACTERIANAS Y BACTERIOFAGOS.....	60
I.1. Conservación de las cepas.....	60
I.2. Conservación de los fagos	61
I.3. Propagación de los fagos	61
I.4. Titulación de los fagos	62
I.5. Caracterización de los bacteriofagos	63
I.5.1. Microscopía electrónica.....	63
I.5.2. Caracterización molecular	63
II. AISLAMIENTO DE MUTANTES ESPONTÁNEOS FAGORRESISTENTES A PARTIR DE CEPAS SENSIBLES A FAGOS.....	64
II.1. Metodologías utilizadas en el aislamiento de los mutantes fagorresistentes	65
II.1.1. Medio agarizado.....	65
II.1.2. Cultivos secundarios	65
III. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO FAGORRESISTENCIA	66
III.1. Confirmación de la fagorresistencia.....	66
III.2. Eficiencia de recuperación de mutantes fagorresistentes.....	67
III.3. Espectro de hospedadores de los mutantes fagorresistentes	67
III.4. Estabilidad de la fagorresistencia.....	67
III.5. Nivel de fagorresistencia (EOP, efficiency of plaquing)	68
III.6. Lisogenia.....	68
III.7. Tasas de adsorción.....	68
IV. CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES FAGORRESISTENTES	69
IV.1. Morfología	69
IV.2. Perfil fermentativo de azúcares	70
IV.3. Estudios genéticos	70
IV.3.1. Extracción del ADN total bacteriano	71

IV.3.2. Análisis de amplificación y restricción del ADN ribosomal (PCR-ARDRA)	71
IV.3.3. RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction)	72
IV.4. Análisis de proteínas de pared mediante SDS-PAGE.....	73
IV.4.1. Extracción de proteínas de la pared bacteriana	74
IV.4.2. Separación de las proteínas de pared por SDS-PAGE	74
IV.5. Caracterización tecnológica	75
IV.5.1. Actividad acidificante.....	75
IV.5.2. Actividad proteolítica.....	75
IV.5.3. Cinéticas de acidificación en leche	76
IV.5.4. Caracterización de las variantes "lentas" aisladas de <i>Lb. delbrueckii</i> Ab ₁	76
IV.6. Caracterización biológica <i>in vitro</i>	77
IV.6.1. Tolerancia a jugo gástrico simulado	78
IV.6.2. Resistencia a la bilis	79
IV.6.3. Resistencia a lisozima.....	79
IV.6.4. Uso de prebióticos.....	80
IV.7. Caracterización probiótica <i>in vitro</i>	80
IV.7.1. Capacidad de deconjugar sales biliares	80
IV.7.2. Actividad de β-galactosidasa (β-gal)	81
IV.7.3. Hidrofobicidad	82
IV.7.4. Inhibición de bacterias patógenas.....	82
IV.7.5. Naturaleza química de las sustancias inhibitorias de bacterias patógenas.....	83
IV.7.6. Adhesión <i>in vitro</i> de <i>Lb. delbrueckii</i> a células eucarióticas en cultivo.....	84
IV.7.7. Inhibición de la adhesión e invasión de <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis por sobrenadantes de cepas de <i>Lb. delbrueckii</i>	85
IV.8. Estudio <i>in vivo</i> de la capacidad inmunoestimulante de <i>Lb. delbrueckii</i> y sus mutantes fagorresistentes	87
IV.8.1. Animales y condiciones de alimentación	87
IV.8.2. Ensayo de traslocación	88
IV.8.3. Estudio histológico del intestino	88
IV.9. Obtención de cepas con resistencia incrementada a bilis	89

IV.9.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de bilis	89
IV.9.2. Obtención de derivados adaptados a bilis	89
IV.9.3. Estabilidad de los derivados adaptados a bilis	89
IV.9.4. Confirmación de la fagorresistencia y tasas de adsorción	90
IV.9.5. Curvas de crecimiento	90
IV.9.6. Actividad acidificante y proteolítica	91
RESULTADOS	92
I. CARACTERIZACIÓN DE LOS BACTERIOFAGOS	92
I.1. Microscopía electrónica	92
I.2. Caracterización molecular	92
I.2.2. Perfiles de Restricción	92
I.2.3. Sitios de empaquetamiento (<i>cos-</i> , <i>pac-</i> sites)	93
II. AISLAMIENTO DE MUTANTES ESPONTÁNEOS FAGORRESISTENTES A PARTIR DE CEPAS SENSIBLES A FAGOS	95
III. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO FAGORRESISTENCIA	95
III.1. Eficiencia de recuperación de mutantes fagorresistentes	95
III.2. Espectro de hospedadores de los mutantes fagorresistentes	97
III.3. Estabilidad de la fagorresistencia	97
III.4. Nivel de fagorresistencia (EOP)	98
III.5. Lisogenia	98
III.6. Tasas de adsorción	99
IV. CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES FAGORRESISTENTES	100
IV.1. Morfología	100
IV.2. Perfil fermentativo de azúcares	103
IV.3. Estudios genéticos	103
IV.3.1. PCR- ARDRA	103
IV.3.2. Perfiles RAPD-PCR	103
IV.4. Análisis de las proteínas de pared mediante SDS-PAGE	106
IV.5. Caracterización tecnológica	107
IV.5.1. Actividad acidificante y proteolítica	107
IV.5.2. Cinéticas de acidificación en leche	113
IV.5.3. Caracterización de las variantes "lentas" aisladas de <i>Lb. delbrueckii</i> Ab ₁	115
IV.6. Caracterización biológica <i>in vitro</i>	116
IV.6.1. Tolerancia a jugo gástrico simulado	117

IV.6.2. Resistencia a bilis	117
IV.6.3. Resistencia a lisozima.....	118
IV.6.5. Uso de prebióticos.....	119
IV.7. Caracterización probiótica <i>in vitro</i>	121
IV.7.1. Capacidad de deconjugar sales biliares	121
IV.7.2. Actividad de β -galactosidasa	123
IV.7.3. Hidrofobicidad	123
IV.7.4. Inhibición de bacterias patógenas.....	124
IV.7.5. Naturaleza química de las sustancias inhibidoras de bacterias patógenas.....	127
IV.7.6. Adhesión <i>in vitro</i> de <i>Lb. delbrueckii</i> a células eucarióticas en cultivo...128	
IV.7.7. Inhibición de la adhesión e invasión de <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis por sobrenadantes de cepas de <i>Lb. delbrueckii</i>	132
IV.8. Estudio <i>in vivo</i> de la capacidad inmunoestimulante de cepas de <i>Lb.</i> <i>delbrueckii</i> sensibles a fagos, y sus mutantes espontáneos fagorresistentes.....	135
IV.8.1. Ensayo de traslocación	135
IV.8.2. Estudio histológico del intestino	136
IV.8.3. Determinación del número de células IgA ⁺ presentes en el intestino delgado por inmunofluorescencia	136
IV.9. Derivados adaptados a bilis	137
IV.9.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).....	138
IV.9.2. Obtención de derivados adaptados a bilis	138
IV.9.4. Confirmación de la fagorresistencia y tasas de adsorción.....	146
IV.9.5. Curvas de crecimiento.....	146
IV.9.6. Actividad acidificante y proteolítica.....	149
DISCUSIÓN	151
CONCLUSIONES.....	171
BIBLIOGRAFÍA	172
ANEXO: MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS. FORMULACIONES.....	189

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Índice de Tablas

Tabla 1. Lactobacilos encontrados normalmente en los productos lácteos fermentados, clasificados según el tipo de fermentación de azúcares..... 12

Tabla 2. Requisitos a cumplir por un microorganismo probiótico.....22

Tabla 3. Criterios a seguir para la selección de un microorganismo probiótico para la industria láctea fermentativa25

Tabla 4. Mutantes espontáneos fagorresistentes obtenidos a partir de cepas fago-sensibles de *Lb. delbrueckii*, mediante cultivos secundarios (CS) y en medio agarizado (MA).....96

Tabla 5. Estabilidad de la fagorresistencia de los mutantes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* YSD V, Ab₁ e Ib₃.....97

Tabla 6. Nivel de resistencia fágica (EOP), y mecanismos de resistencia implicados (lisogenia y bloqueo en la adsorción) en los mutantes espontáneos fagorresistentes obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* YSD V, Ab₁ e Ib₃.....98

Tabla 7. Actividad acidificante y proteolítica de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus mutantes espontáneos fagorresistentes, a partir de cultivos en LDR (24 h, 42°C).....109

Tabla. 8. Actividad acidificante y proteolítica de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y sus mutantes espontáneos fagorresistentes, a partir de cultivos en LDR (24 h, 42°C).....110

Tabla 9. Actividad acidificante y proteolítica de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y sus mutantes espontáneos fagorresistentes, a partir de cultivos en LDR (24 h, 42°C)111

Tabla 10. Desarrollo de variantes fagorresistentes “lentas” aisladas a partir de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ , en diferentes condiciones de cultivo (pH alcanzado luego de 24 h de incubación a 42 °C)	115
Tabla 11. Análisis de varianza de una vía aplicado a los valores de pH obtenidos a partir del desarrollo de las variantes fagorresistentes “lentas”, aisladas de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ , en distintas condiciones de cultivo (24 h, 42°C)	116
Tabla 12. Tolerancia de cepas de <i>Lb. delbrueckii</i> y sus mutantes fagorresistentes a jugo gástrico simulado	118
Tabla 13. Desarrollo de cepas de <i>Lb. delbrueckii</i> y sus mutantes fagorresistentes en presencia de 0,3, 0,5 y 1,0% de bilis	119
Tabla 14. Desarrollo de cepas de <i>Lb. delbrueckii</i> y sus mutantes fagorresistentes en presencia de 25, 50 y 100 ppm de lisozima.....	120
Tabla 15. Desarrollo de cepas de <i>Lb. delbrueckii</i> y sus mutantes fagorresistentes en presencia de rafinosa, lactulosa, inulina y xilitol (2%, p/v).....	121
Tabla 16. Características probióticas <i>in vitro</i> (deconjugación de sales biliares, actividad de β-galactosidasa e hidrofobicidad) de cepas de <i>Lb. delbrueckii</i> y sus mutantes fagorresistentes.....	122
Tabla 17. Inhibición de bacterias patógenas por parte de sobrenadantes libres de células (SLC) de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V, <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> lb ₃ y <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab ₁ y sus respectivos mutantes fagorresistentes.....	125
Tabla 18. Halos de inhibición (en cm) de SLC de cultivos de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ y sus mutantes fagorresistentes A ₇ y A ₁₇ , sometidos a distintos tratamientos	129

Tabla 19. Halos de inhibición (en cm) de SLC de cultivos de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ib ₃ y su mutante fagorresistente I ₃₉ , sometidos a distintos tratamientos	130
Tabla 20. Halos de inhibición (en cm) de SLC de cultivos de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V y su mutante fagorresistente V ₂ , sometidos a distintos tratamientos	131
Tabla 21. Desarrollo (24 h, 37°C) de cepas de <i>Lb. delbrueckii</i> y sus mutantes fagorresistentes en medio líquido adicionado de bilis.....	138
Tabla 22. Sensibilidad fágica y tasas de adsorción en los derivados con resistencia incrementada a bilis, obtenidos a partir de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ y de sus mutantes fagorresistentes A ₇ y A ₁₇	147
Tabla 23. Valores de pH, acidez y actividad proteolítica, desarrolladas en LDR, para derivados con resistencia incrementada a bilis, obtenidos a partir de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ y de sus mutantes fagorresistentes A ₇ y A ₁₇	150

Índice de Figuras

Fig. 1. Morfología básica de fagos de bacterias lácticas.....	35
Fig. 2. Tipos morfológicos básicos de bacteriofagos, según Bradley (1967).....	35
Fig. 3. Familias y morfotipos básicos de fagos de bacterias lácticas, según Ackermann y col. (1984).	36
Fig. 4. Ciclo lítico de un bacteriofago.	39
Fig. 5. Ciclo lisogénico de un fago y su relación con el ciclo lítico.....	40

Fig. 6. Micrografías electrónicas de los fagos YAB, lb ₃ y BYM.....	92
Fig. 7. Perfiles de restricción del ADN (electroforesis en gel de agarosa 0,8%) de los fagos BYM, lb ₃ y YAB, obtenidos con las endonucleasas <i>EcoRV</i> , <i>SalI</i> y <i>XhoI</i>	93
Fig. 8. Perfiles de restricción del ADN (electroforesis en gel de agarosa 0,8%), ligados y sin ligar, de los fagos BYM, lb ₃ y YAB, obtenidos con las endonucleasas <i>BglII</i> y <i>HindIII</i>	94
Fig. 9. Distribución porcentual de las tasas de adsorción exhibidas por los mutantes espontáneos fagorresistentes aislados a partir de <i>Lb. delbrueckii</i> YSD V, <i>Lb. delbrueckii</i> Ab ₁ y <i>Lb. delbrueckii</i> lb ₃ bajo presión selectiva de los fagos BYM, YAB e lb ₃ , respectivamente	100
Fig. 10. Morfología celular de la cepa fago-sensible <i>Lb. delbrueckii</i> Ab ₁ , y sus mutantes espontáneos fagorresistentes A ₇ y A ₁₇ . Fotografías obtenidas por observación en microscopio óptico de contraste de fases (1000 x).....	101
Fig. 11. Morfología celular de la cepa fago-sensible <i>Lb. delbrueckii</i> YSD V, y su mutante espontáneo fagorresistente V ₂ . Fotografías obtenidas por observación en microscopio óptico de contraste de fases (1000 x).....	102
Fig. 12. Morfología celular de la cepa fago-sensible <i>Lb. delbrueckii</i> lb ₃ , y su mutante espontáneo fagorresistente l ₃₉ . Fotografías obtenidas por observación en microscopio óptico de contraste de fases (1000 x).....	102
Fig. 13. Perfiles PCR-ARDRA de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V y <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ e lb ₃ , y de algunos de sus mutantes fagorresistentes, digeridos o no digeridos con <i>EcoRI</i>	104
Fig. 14. Dendrograma obtenido por comparación y reagrupamiento (UPGMA) de los perfiles RAPD-PCR de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V, <i>Lb.</i>	

<i>delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ib ₃ , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ y sus respectivos mutantes fagorresistentes, usando los primers M13 y 1254	105
Fig. 15. Perfiles de proteínas de la superficie de pared celular obtenidos por SDS-PAGE de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ILC 333, <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ILC 232, <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V, <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ib ₃ y <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁	106
Fig. 16. Distribución porcentual de los mutantes espontáneos fagorresistentes, según el pH alcanzado por los cultivos en LDR (24 h, 42°C)	112
Fig. 17. Distribución porcentual de los mutantes espontáneos fagorresistentes, según su actividad acidificante (% de ácido láctico), valorada en cultivos en LDR (24 h, 42°C).....	112
Fig. 18. Distribución porcentual de los mutantes espontáneos fagorresistentes, según su actividad proteolítica (OPA Test, A ₃₄₀), valorada en cultivos en LDR (24 h, 42°C)	113
Fig. 19. Cinéticas de acidificación de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ib ₃ , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V y sus respectivos mutantes fagorresistentes a 42°C en LDR.....	114
Fig. 20. Hidrofobicidad de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ib ₃ y <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V	124
Fig. 21. Halos de inhibición obtenidos sobre <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313, <i>S. aureus</i> 76, <i>E. coli</i> V517 y <i>Salmonella</i> sp. OMS-Ca, utilizando los SLC de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V, su mutante fagorresistente V ₂ , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ib ₃ y su mutante fagorresistente I ₃₉ , mediante la técnica de difusión en agar.....	126
Fig. 22. Halos de inhibición obtenidos sobre <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313, <i>S. aureus</i> 76, <i>E. coli</i> V517 y <i>Salmonella</i> sp. OMS-Ca, utilizando los SLC de <i>Lb.</i>	

<i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab ₁ , y sus mutantes fagorresistentes A ₇ y A ₁₇ , mediante la técnica de difusión en agar	127
Fig. 23. Halos de inhibición obtenidos utilizando SLC (sometidos a distintos tratamientos), de <i>Lb. delbrueckii</i> Ab ₁ e Ib ₃ , sobre <i>E. coli</i> V517 y <i>Salmonella</i> sp. OMS-Ca.....	132
Fig. 24. Adhesión de cepas de <i>Lb. delbrueckii</i> sensibles a fagos (Ab ₁ , YSD V e Ib ₃) y sus respectivos mutantes fagorresistentes (A ₇ , A ₁₇ , V ₂ e I ₃₉) a células intestinales Caco-2/TC-7	133
Fig. 25. Asociación de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ y <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V a células Caco-2/TC-7. Fotografías obtenidas por examen al microscopio óptico (400 x), de las células Caco-2/TC-7 cultivadas sobre portaobjetos redondos, fijadas con formol y coloreadas con Gram, luego del ensayo de adhesión	134
Fig. 26. Efecto del pretratamiento de <i>S. enterica</i> serovar Enteritidis con SLC de cepas de <i>Lb. delbrueckii</i> sensibles a fagos (Ab ₁ , YSD V e Ib ₃) y sus respectivos mutantes fagorresistentes (A ₇ , A ₁₇ , V ₂ e I ₃₉) en relación a la capacidad de <i>S. enterica</i> serovar Enteritidis para adherir e invadir células Caco-2/TC-7.....	135
Fig. 27. Efecto de la administración oral de cultivos de <i>Lb. delbrueckii</i> sensibles a fagos (Ab ₁ , YSD V e Ib ₃) y de sus mutantes espontáneos fagorresistentes (A ₇ , A ₁₇ , V ₂ e I ₃₉) durante 2, 5 o 7 días consecutivos (10 ⁸ UFC/día/ratón), sobre el número de células productoras de IgA en la lámina propia del intestino delgado de ratones.....	137
Fig. 28. Estabilidad (metodología a) de derivados adaptados a bilis de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ y sus mutanes A ₇ y A ₁₇ . Recuentos en agar MRS (48h, 37°C) adicionado o no de bilis, luego de seis repiques en caldo MRS.....	140

Fig. 29. Estabilidad (metodología a) de derivados adaptados a bilis de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V y su mutante V ₂ . Recuentos en agar MRS (48h, 37°C) adicionado o no de bilis, luego de seis repiques en caldo MRS.....	141
Fig. 30. Estabilidad (metodología b) de derivados adaptados a bilis de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ y sus mutantes A ₇ y A ₁₇ . Desarrollo (DO ₅₆₀) de los cultivos en caldo MRS adicionado o no de bilis, luego de seis repiques en caldo MRS.....	142
Fig. 31. Estabilidad (metodología b) de derivados adaptados a bilis de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V y su mutante V ₂ . Desarrollo (DO ₅₆₀) de los cultivos en caldo MRS adicionado o no de bilis, luego de seis repiques en caldo MRS	143
Fig. 32. Estabilidad (metodología b) de derivados adaptados a bilis de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ y sus mutantes A ₇ y A ₁₇ . Recuentos en agar MRS de los cultivos en caldo MRS adicionado o no de bilis, luego de seis repiques en caldo MRS	144
Fig. 33. Estabilidad (metodología b) de derivados adaptados a bilis de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V y su mutante V ₂ . Recuentos en agar MRS de los cultivos en caldo MRS adicionado o no de bilis, luego de seis repiques en caldo MRS	145
Fig. 34. Morfología celular de la cepa fago-sensible <i>Lb. delbrueckii</i> Ab ₁ , y su derivado Ab ₁ ^{0,9} adaptado a 0,9% de bilis. Fotografías obtenidas por observación en microscopio óptico de contraste de fases (1000 x).....	146
Fig. 35. Cinéticas de crecimiento de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ y sus derivados adaptados a 0,3% y 0,9% de bilis en caldo MRS, sin el agregado o con agregado de 0,3% o 0,9% de bilis.....	148

Listado de Abreviaturas y símbolos

A	Absorbancia
Abi	Infección abortiva (Abortive infection)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
ARDRA	Análisis de Restricción del ADN Ribosomal Amplificado
ARN	Ácido ribonucleico
ARNdc	Ácido ribonucleico doble cadena
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bacterias lácticas
BHS	Hidrolasas de sales biliares (Bile-salt hidrolases)
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CS	Cultivos secundarios
DO	Densidad óptica
EOP	Eficiencia de plaqueo (Efficiency of plaquing)
EPS	Exopolisacáridos
ERasa	Endonucleasa de restricción
Glu	Glucosa
GRAS	Generally Recognized As Safe
HC	Hidrolizado de caseína
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
ILC	Istituto Sperimentale Lattiero Caseario
JGS	Jugo gástrico simulado
Kb	Kilobases
kDa	kiloDaltons

LDR	Leche descremada reconstituida
LPS	Sistema de Lactoperoxidasa
m.o.i.	Multiplicidad de infección (multiplicity of infection)
MA	Medio agarizado
MTasa	Metilasa
n_R	Número de mutantes fagorresistentes confirmados
OPA	o-ftaldehído
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
Per	Phage-encoded resistance
R/M	Restricción / Modificación
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida- dodecil sulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SLC	Sobrenadante libre de células
TC	Taurocolato de sodio
TDC	Taurodeoxicolato de sodio
UFC	Unidades formadoras de colonias
UFP	Unidades formadoras de placas
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages
UV	Ultravioleta
V	Voltios
λ	Longitud de onda
Φori	Origen de replicación fágica

RESUMEN

Uno de los problemas más graves a los cuales se enfrenta la industria láctea fermentativa es el ataque de los cultivos starters por parte de bacteriofagos. La infección de los cultivos por fagos puede conducir a un desempeño deficiente de las cepas, e incluso inhibir completamente su actividad. Esta problemática puede llevar a importantes pérdidas económicas, ya que una actividad inadecuada de los cultivos iniciadores se traduce en la obtención de productos fermentados defectuosos y que, por lo tanto, no pueden ser comercializados. La industria láctea fermentativa utiliza ampliamente cultivos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* para la elaboración de leches fermentadas y quesos. Por lo tanto, estas dos subespecies de *Lb. delbrueckii* no escapan a la problemática de las infecciones fágicas.

Existen numerosas estrategias que son aplicadas para controlar las infecciones fágicas, que incluyen correcta limpieza del ambiente industrial, uso de sanitizantes, ventilación adecuada, uso de medios inhibidores de fagos, rotación de cultivos y uso de cultivos con resistencia fágica mejorada. Hace algunos años, los estudios estaban orientados a la obtención de cepas modificadas genéticamente, en las cuales el fenotipo fagorresistencia era obtenido por manipulación genética de las mismas. Sin embargo, aún hoy en día existen restricciones legales que impiden el uso de estas cepas ingenierizadas en la industria alimenticia. En cambio, el aislamiento de los mutantes espontáneos fagorresistentes, es una estrategia que puede considerarse "natural" para la obtención de cepas mejoradas, además de ser simple y rápida.

Considerando lo expuesto, uno de los objetivos principales del presente trabajo de Tesis estuvo orientado hacia el aislamiento y el estudio de derivados espontáneos fagorresistentes a partir de las cepas fago-sensibles de *Lb. delbrueckii* Ab₁, Ib₃ e YSD V, de alto valor comercial.

De las dos metodologías utilizadas, el aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes confirmados fue generalmente más efectivo cuando se usó la técnica de *cultivos secundarios* en comparación con la de *medio agarizado*.

Las variantes espontáneas presentaron altos niveles de fagorresistencia, evidenciado a través de una elevada estabilidad y valores de EOP (efficiency of plaquing) $< 10^{-8}$.

En cuanto a la identificación de los mecanismos involucrados en la resistencia fágica de los mutantes, no fue posible detectar mecanismos de fagorresistencia ligados a lisogenia. Al estudiar la adsorción de los fagos sobre los mutantes aislados, se vio que aquellos obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* Ab₁ fueron parcial o completamente incapaces de adsorber fagos. En cambio, aquellos mutantes obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* YSD V, presentaron tasas de adsorción elevadas, lo que sugiere la existencia de mecanismos de interferencia de la inyección del ADN fágico, la presencia de algún mecanismo de resistencia intracelular (tipo R/M o Abi), o una combinación de ambos. Los mutantes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* Ib₃ presentaron tasas de adsorción distribuidas heterogéneamente, siendo muy elevadas en algunos casos, y muy bajas en otros.

El análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA) permitió clasificar a las cepas Ab₁ e Ib₃ y sus respectivos mutantes, como *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, mientras que YSD V y sus mutantes se clasificaron como *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Por otro lado, el uso de RAPD-PCR permitió la construcción de tres grupos o clusters bien definidos, uno por cada grupo de mutantes fagorresistentes y sus cepas madres fago-sensibles, con altos coeficientes de similitud en cada caso ($> 94\%$). Este hecho confirmó que cada grupo de mutantes estudiado derivó de las mismas, y que no existió ningún tipo de contaminación externa.

Las propiedades tecnológicas estudiadas (actividad acidificante y proteolítica, y velocidad de acidificación en leche) permitieron observar que las variantes aisladas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ fueron similares a sus cepas madres. Sin embargo, a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ se obtuvieron dos grupos de mutantes con distinto desempeño tecnológico, variantes "rápidas" y "lentas". Las primeras presentaron características tecnológicas similares a aquellas de la cepa madre, mientras que el segundo grupo presentó deficiencias en cuanto a la actividad acidificante y proteolítica.

En los últimos años, se ha ido revalorizando el rol de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y subsp. *lactis* como microorganismos con propiedades probióticas. Por esta razón, se consideró interesante el estudio de las propiedades biológicas y probióticas de los mutantes fagorresistentes de *Lb. delbrueckii* aislados en el presente trabajo. En general, se observó escasa tolerancia al jugo gástrico artificial (pH 2) y a bilis, mientras que existió buen desarrollo en presencia de lisozima. El agregado de leche mejoró la tolerancia en el jugo gástrico simulado. Cuando se estudió la capacidad de las cepas y sus mutantes para utilizar prebióticos, se observó que la inulina fue el preferido por la mayoría de las cepas analizadas.

Se estudió el potencial probiótico de las cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes. Ninguna de las cepas estudiadas fue capaz de deconjugarse sales biliares, aunque algunas de ellas desarrollaron en presencia de las mismas. La actividad de β -galactosidasa estuvo presente en todas las cepas estudiadas en niveles variables. *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* lb₃ y su mutante lb₃₉ presentaron los valores más elevados de hidrofobicidad. Tanto las cepas fago-sensibles de *Lb. delbrueckii* como los derivados espontáneos fagorresistentes, revelaron actividad antibacteriana en sus sobrenadantes libres de células (SLCs), siendo el ácido láctico la principal sustancia implicada en la inhibición de las bacterias patógenas. En este trabajo, las tres cepas madres de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes espontáneos fagorresistentes, fueron capaces de adherir a células Caco-2/TC-7 en distinta proporción. Al estudiar la capacidad de los SLCs de las cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes para inhibir la adhesión e invasión de una bacteria patógena (*S. enterica* serovar. Enteritidis) a células Caco-2/TC-7, se observó que los componentes antimicrobianos producidos por las cepas en estudio produjeron una disminución marcada en la adhesión del patógeno a las células eucarióticas, aunque fueron más efectivos contra la invasión del patógeno a las mismas. Asimismo, se estudió la capacidad de las cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes para activar la respuesta inmunológica en el intestino de ratones, observando que todas ellas fueron capaces de activar la producción de células productoras de IgA en la lámina propia.

Teniendo en cuenta la escasa tolerancia de las cepas y sus mutantes fagorresistentes a la presencia de bilis, se procedió al aislamiento de derivados adaptativos con mayor tolerancia a bilis, a partir de estas mismas cepas. De esta

manera, fue posible aislar derivados de *Lb. delbrueckii* Ab₁ y sus mutantes fagorresistentes A₇ y A₁₇ con resistencia a 0,3, 0,6 y 0,9% de bilis, presentando buena estabilidad. En cambio, no fue posible aislar derivados a partir de *Lb. delbrueckii* Ib₃ y su mutante I₃₉, y aquellos derivados obtenidos de *Lb. delbrueckii* YSD V y V₂ presentaron escasa estabilidad a lo largo de los sucesivos repiques.

Estos resultados indican que *Lb. delbrueckii* debe ser valorado más allá de su rol como bacteria starter, ya que muchas cepas pertenecientes a esta especie poseen propiedades biológicas y probióticas interesantes. Estas características, sumadas a una fagorresistencia mejorada, los convierten en cultivos muy atractivos que podrían ser incluidos como componentes de alimentos funcionales.

Fermentative dairy industry must deal with bacteriophages that attack starter cultures. Infection of starters with phages may produce slow or complete inhibition of milk acidification by lactic acid bacteria (LAB). This problem may cause important economical losses, since the fermented products obtained can be defective, and cannot be commercialized. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* are widely used in the manufacture of fermented milks and cheeses and therefore, these species are susceptible to phage infections.

There are many strategies to minimize phage infections, including regular cleaning and sanitation of dairy factories, air filtration, use of phage-inhibitory media, strain rotation systems, and phage-resistant strains. Some years ago, studies were focused on the development of genetic modified strains. However, these strains have never been used in food industry because of legal restrictions. On the other side, the isolation of spontaneous phage-resistant mutants is considered a "natural" and simple strategy to obtain improved phage-resistant strains.

The aim of this work was focused on the isolation and study of spontaneous phage-resistant mutants from three phage-sensitive and commercially valuable *Lb. delbrueckii* strains (identified as Ab₁, lb₃ and YSD V).

The isolation of true phage-resistant mutants was more effective when the *secondary culture* rather than *agar plate* technique was used.

Spontaneous derivatives isolated showed high phage-resistance levels taking into account their stability and EOP (efficiency of plaquing) values.

Phage-resistance mechanisms were not linked to lisogeny. *Lb. delbrueckii* Ab₁ mutants showed diminished phage adsorption rates, while those obtained from *Lb. delbrueckii* YSD V showed high adsorption rates. This last result suggests blocking of viral DNA injection, some intracellular phage-resistance mechanism (Abi or R/M) or a combination of both. *Lb. delbrueckii* lb₃ phage-resistant mutants showed heterogeneously distributed adsorption rates.

Amplification and restriction analysis of the 16S rDNA genes (PCR-ARDRA) allowed us to classify strain YSD V and its phage-resistant mutants as *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, and strains Ab₁, Ib₃ and their respective mutants as *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. On the other hand, Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR) showed to be a reliable technique for the construction of three well-defined clusters, one for each group of phage-resistant mutants that included the respective parent strain. This result confirmed that mutants were actually obtained from them, and there were not external contamination.

Technological properties (acidifying and proteolytic activities and acidification kinetics) of spontaneous mutants obtained from *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V and *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ showed to be similar to those exhibited by their respective parent strains. However, two groups ("fast" and "slow" variants) were obtained from *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁. "Fast" mutants showed a technological performance similar to the parent strain, while "slow" ones presented poor acidifying and proteolytic activities.

Over the last years, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and subsp. *lactis* have proved to have good probiotic properties. So, an additional aim of this work was to study biological and probiotic properties of the phage-resistant mutants obtained. Poor tolerance to simulated gastric juice (pH 2) and bilis was generally observed, while most of the strains showed good tolerance to lysozyme. When milk was added to the simulated gastric juice, there was no decrease in cell viable counts of strains.

Prebiotic compounds were used with different efficiencies, being inulin the most fermented prebiotic for the majority of the strains assayed.

The probiotic potential of *Lb. delbrueckii* strains and their phage-resistant mutants, was also investigated. In general, resistance to bile salts was observed among the strains, even though they were not able to deconjugate them. β -galactosidase activity was present among all parent strains and mutants studied. *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ and its mutant I₃₉ showed the highest values of hydrophobicity. The strong antibacterial activity displayed toward pathogens was mainly due to the production of lactic acid. Sensitive strains and their phage resistant variants were able to adhere to Caco-2/TC-7

monolayers and significantly inhibited the invasion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis into Caco-2/TC-7 cells. Furthermore, *Lb. delbrueckii* strains and their phage-resistant mutants were able to stimulate the gut immune system, since IgA⁺ cells were found in the lamina propria of small intestine of mice.

Considering the susceptibility of phage-resistant mutants against bilis, derivatives with improved bilis tolerance were isolated. It was possible to isolate stable bilis resistant derivatives from *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ and its phage-resistant mutants A₇ and A₁₇. These adaptative derivatives showed a good resistance to 0.3, 0.6 and 0.9% of bilis. However, it was not possible to obtain stable bilis-resistant derivatives from *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V. It was not possible to obtain derivatives from *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* lb₃ and its phage-resistant mutants.

The present study provides evidence that several *Lb. delbrueckii* strains and their phage-resistant mutants maintained not only the desired technological properties of the parent strains but also some biological and probiotic properties. These features, in addition to an improved phage resistance, make these strains into excellent candidates for industrial applications in functional foods.

INTRODUCCIÓN

I. LAS BACTERIAS LACTICAS

Las bacterias lácticas (BAL) constituyen un grupo de bacterias Gram positivas, que poseen en común una serie de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Se puede definir a las bacterias lácticas "típicas" como cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, catalasa negativos, carentes de citocromos, de hábitat anaeróbico pero aerotolerantes, exigentes a nivel nutricional, ácido-tolerantes, y productores de ácido láctico como producto final mayoritario a partir de la fermentación de azúcares. En general, las BAL están asociadas a medios ricos en nutrientes, como son ciertos productos alimenticios (leche, carne, bebidas, vegetales), pero algunas forman parte de la flora normal de la boca, intestino y vagina de los mamíferos (Axelsson, 1998). La producción de ácido por parte de las BAL disminuye el pH de los alimentos que poseen algún carbohidrato fermentable. De esta forma, las BAL pueden suprimir otras bacterias, incluyendo aquellas que son alterantes o patógenas (Limsowtin y col., 2003).

La clasificación de las bacterias lácticas en distintos géneros se basa principalmente en el estudio de la morfología, fermentación de la glucosa (homofermentantes o heterofermentantes), crecimiento a distintas temperaturas (mesófilas o termófilas), configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer en presencia de altas concentraciones de sal, y en la tolerancia a ácidos o álcalis. También puede ser de utilidad el estudio de la composición de los ácidos grasos y de los constituyentes de la pared celular (Axelsson, 1998). El advenimiento de técnicas de análisis de ADN (estudios de hibridación y comparación de secuencias de ADN) ha permitido estudiar a nivel genético las similitudes y las diferencias entre los organismos. En la actualidad, los estudios de hibridación de ADN proporcionan la medida más aceptada respecto de si dos organismos pertenecen o no a la misma especie. Las propiedades fenotípicas continúan siendo muy importantes y son marcadores útiles para la identificación y la clasificación de las bacterias, pero no siempre permiten conocer de manera precisa las relaciones genéticas existentes entre ellas (Limsowtin y col., 2003).

El grupo de las BAL comprende 11 géneros: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

Pediococcus, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*. Sin embargo, las especies de mayor importancia desde el punto de vista industrial corresponden a *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Su participación es fundamental en la mayoría de los procesos de obtención de alimentos fermentados ya que, de un modo parcial o total, intervienen en el desarrollo de textura y de características organolépticas, así como en la preservación de una gran variedad de productos alimenticios de origen vegetal (pickles, vino, cerveza, ensilados) y de origen animal (quesos, leches fermentadas, manteca, embutidos) (Aguirre y Collins, 1993).

Como un primer criterio de clasificación de las bacterias que integran este grupo, se pueden separar según la vía metabólica utilizada para degradar los carbohidratos en:

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

Bacterias lácticas heterofermentantes: siguen la vía 6-fosfogluconato, a través de la cual originan una mezcla de compuestos, además de ácido láctico: dióxido de carbono y etanol o ácido acético, en cantidades variables según la especie considerada (Axelsson, 1998).

Otro criterio de clasificación de las BAL, de especial interés industrial, es aquel que considera la temperatura óptima de desarrollo, según la cual se agrupan en:

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

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

1.1. Las bacterias lácticas en la industria láctea fermentativa

Para que una BAL pueda ser utilizada en la industria láctea fermentativa, debe contar con los sistemas enzimáticos adecuados que le permitan desarrollarse en un sustrato como la leche. Los géneros utilizados como cultivos iniciadores (starters) en las fermentaciones lácticas son:

- *Lactococcus*
- *Leuconostoc*
- *Streptococcus*
- *Lactobacillus*

Las bacterias del género *Lactococcus* (*Lc.*) se presentan como cocos aislados, en pares o en cadenas. Desarrollan a 10°C pero no a 45°C, y fermentan los azúcares de manera homofermentativa, produciendo ácido *L-láctico*. Dentro de este grupo, la especie utilizada en cultivos iniciadores es *Lc. lactis*, la cual se divide en dos subespecies, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* y *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Algunas cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* usadas en los starters tienen la capacidad de metabolizar el citrato produciendo CO₂, diacetilo y otros compuestos intermedios que dan el aroma típico, por ejemplo al queso Gouda. En ocasiones, se refiere a estos lactococos "citrato positivos" (Cit⁺) como *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Cogan, 1996; Limsowtin y col., 2003).

Las bacterias del género *Leuconostoc* (*Ln.*) se agrupan en pares y cadenas, y ocasionalmente presentan forma elipsoidal. A diferencia de *Lactococcus*, *Leuconostoc* fermenta los azúcares en forma heterofermentativa produciendo ácido *D-láctico* en vez de ácido *L-láctico*. En la industria láctea fermentativa, los leuconostocs (especialmente *Ln. lactis* y *Ln. mesenteroides*) son importantes por su capacidad de producir CO₂ y diacetilo a partir del citrato de la leche. El diacetilo es el componente de flavor más importante de la manteca, queso fresco y otros quesos como el Gouda y el Edam. El CO₂ es importante para la formación de ojos en estos quesos (Cogan, 1996; Axelsson, 1998; Limsowtin y col., 2003).

Existen más de 50 especies y subespecies reconocidas dentro del género *Streptococcus*, pero sólo *S. thermophilus* forma parte de los cultivos iniciadores en la industria láctea. Se presenta como cocos en pares o en cadenas, algunas de las cuales pueden ser muy largas. Al igual que *Lactococcus*, *S. thermophilus* fermenta azúcares de forma homofermentativa produciendo ácido L-láctico. Es capaz de desarrollar a 45°C, lo que permite una diferenciación sencilla con respecto a *Lactococcus* y *Leuconostoc*, los cuales no desarrollan a temperaturas superiores a 40°C. Forma parte de los cultivos termófilos usados en la elaboración de yogur y de quesos de pasta cocida (quesos tipo italianos y suizos), y en general se usa en combinación con lactobacilos termófilos (Cogan, 1996; Limsowtin y col., 2003).

El género *Lactobacillus* (*Lb.*) está compuesto por bacilos generalmente largos en cadenas cortas, aunque también existen bacilos cortos, aislados o en cadenas largas. Este es el género más amplio dentro de las BAL, e incluye a más de 80 especies y subespecies. Se divide en tres grupos según el tipo de fermentación de los carbohidratos:

-Los lactobacilos **homofermentantes obligados** fermentan las hexosas produciendo mayoritariamente ácido láctico. No son capaces de fermentar pentosas ni gluconato.

-Los lactobacilos **heterofermentantes facultativos** fermentan las hexosas produciendo ácido láctico como producto principal, pero bajo condiciones limitantes de glucosa fermentan las hexosas dando ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico. Las pentosas son fermentadas dando ácido láctico y ácido acético.

-Los lactobacilos **heterofermentantes obligados** fermentan las hexosas dando ácido láctico, CO₂, ácido acético y/o etanol, mientras que a partir de las pentosas producen ácido láctico y ácido acético (Curry y Crow, 2003).

Los lactobacilos encontrados frecuentemente en los productos lácteos fermentados se detallan en la Tabla 1 siguiendo la clasificación que se mencionó anteriormente.

Tabla 1. Lactobacilos encontrados normalmente en los productos lácteos fermentados, clasificados según el tipo de fermentación de azúcares (Curry y Crow, 2003).

Homofermentantes	Heterofermentantes	
Obligados	Facultativos	Obligados
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. bifementans</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. coryneformis</i>	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. buchneri</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. fermentum</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. kefir</i>
	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. reuteri</i>

En productos lácteos fermentados como son los quesos y leches fermentadas, los lactobacilos producen múltiples efectos dependiendo de la especie, la cepa, las condiciones de elaboración y el producto. Algunas especies forman parte de los cultivos iniciadores produciendo acidez de manera rápida, mientras que otras forman parte de cultivos probióticos. También pueden producir otras sustancias beneficiosas como bacteriocinas, exopolisacáridos y componentes de aroma y sabor en distintos productos lácteos fermentados (Curry y Crow, 2003).

Las BAL usadas en la industria láctea fermentativa deben cumplir ciertos requisitos, como ser inocuas (denominación GRAS: Generally Recognized As Safe), producir ácido a partir de la fermentación de la lactosa, producir compuestos de aroma y poseer la capacidad de hidrolizar las proteínas de la leche (Ono y col., 1992). Gracias a las cualidades de estas bacterias, durante el proceso de elaboración de productos lácteos se originan una serie de transformaciones que determinan las características organolépticas y la calidad del producto final. Los cambios más importantes que se producen a nivel tecnológico son la fermentación de los azúcares, hidrólisis de proteínas, hidrólisis de ácidos grasos (en menor medida), y síntesis de

compuestos que contribuyen a la textura. A continuación se detallan brevemente estas reacciones.

I.1.1. Fermentación de azúcares. Desarrollo de acidez

La lactosa de la leche es el único carbohidrato del que disponen las BAL para su desarrollo y producción de acidez. Esta capacidad es sumamente explotada a nivel industrial, ya que es el proceso que se intenta favorecer en la elaboración de cualquier producto lácteo fermentado (quesos, yogur, manteca, etc.), aunque debe evitarse durante el almacenamiento de la leche cruda destinada a tratamientos por calor (pasteurización y esterilización), ya que un aumento en la acidez disminuye su aptitud al tratamiento térmico (Reinheimer, 1994). La producción de ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético) conduce a una disminución del pH, impidiendo el crecimiento de muchos microorganismos indeseables, incluyendo patógenos. De esta forma, las bacterias lácticas contribuyen a la conservación de la calidad de los productos fermentados (Mäyrä-Mäkinen y Brigret, 1998).

I.1.2. Desarrollo de compuestos de flavor

Los productos generados a partir de la fermentación de la lactosa, como el ácido láctico, ácido acético, etanol, acetaldehído y diacetilo, contribuyen al desarrollo de los caracteres organolépticos en los productos lácteos. Además de los ya mencionados, los lactobacilos son capaces de generar otros compuestos de flavor a partir de modificaciones de la caseína, grasa, aminoácidos, ácidos grasos libres y de otros componentes menores de la leche como el citrato. Las reacciones descritas a continuación pueden ser llevadas a cabo por los lactobacilos, sin embargo en muchos casos la importancia de su contribución en el producto final dependerá de muchos factores (por ej. del tipo y composición del producto, de la cepa y su concentración, de la temperatura y tiempo de almacenamiento).

Hidrólisis de proteínas

- ◆ Transformación de la caseína. Cuando los péptidos y aminoácidos libres de la leche han sido consumidos, las BAL se procuran compuestos nitrogenados a partir de la hidrólisis de la caseína. La acción combinada de las proteinasas y peptidasas promueve la liberación de péptidos y aminoácidos que pueden contribuir al sabor en quesos y leches fermentadas. Aunque son moderadamente proteolíticas, su actividad resulta suficiente y fundamental para promover su desarrollo en la leche, contribuyendo a la textura y al sabor del producto final (Curry y Crow, 2003).
- ◆ Transformación de aminoácidos. Se está demostrando cada vez más que los lactobacilos pueden utilizar una gran variedad de aminoácidos que probablemente contribuyan a la obtención de compuestos de aroma en los productos lácteos. Por ejemplo, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* utiliza treonina para producir acetaldehído, que es un componente importante de aroma en yogur, especialmente. Otros aminoácidos metabolizados por lactobacilos incluyen arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, aminoácidos azufrados y de cadena ramificada, y aromáticos. Por otro lado, el catabolismo de los aminoácidos puede producir sabores indeseables debidos a p-cresol, indol y escatol, además de aminas biógenas nocivas como tiramina y triptamina (Curry y Crow, 2003).

Transformaciones de los ácidos grasos

Los lactobacilos poseen esterasas que podrían atacar los diglicéridos y monoglicéridos presentes en la leche. La mayor parte de la grasa de la leche está formada por triglicéridos y no está claro el potencial de la lipasa para hidrolizar estos acil-glicerol. Un aumento en los niveles de ácidos grasos libres producidos por acción de los lactobacilos contribuye al sabor en algunos productos lácteos (Curry y Crow, 2003). Sin embargo, la lipólisis es baja en el yogur y por lo tanto no contribuye al flavor del producto de

manera importante. El contenido de ácidos grasos libres del yogur difiere muy poco del contenido en leche. Existen pocos estudios que describan este sistema enzimático en las bacterias del yogur (Zourari y col., 1992).

I.1.3. Síntesis de compuestos que influyen en la textura del producto

Muchas cepas de BAL son capaces de sintetizar polisacáridos extracelulares. Estos compuestos pueden estar estrechamente asociados a la pared celular (ej. polisacáridos capsulares), o ser secretados al medio (ej. polisacáridos viscosos). El término exopolisacárido (EPS) se utiliza normalmente para referirse a ambos tipos de polisacáridos extracelulares (Sutherland, 1972; Cerning, 1995; Low y col., 1998). Estos EPS pueden estar compuestos por monómeros de un solo tipo de azúcar (homopolisacáridos), o por monómeros de distintos tipos de azúcar (heteropolisacáridos). Ejemplos de BAL productoras de homopolisacáridos son *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococcus mutans*, que producen dextranos y glucanos, respectivamente. Los heteropolisacáridos son producidos por muchas BAL, incluyendo *S. thermophilus*, *Lactococcus lactis* y ciertas especies de *Lactobacillus* (De Vuyst y col., 2001). No se ha demostrado que la producción de EPS confiera algún tipo de ventaja en el desarrollo o supervivencia en las bacterias que los producen. Sin embargo, las leches fermentadas con BAL productoras de EPS de tipo viscoso (EPS⁺) presentan generalmente una textura más viscosa, por lo que es común la utilización de cepas EPS⁺ de *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* con el objetivo de mejorar la viscosidad y reducir la sinéresis en el yogur (Cerning, 1995; Stingele y col., 1996). Aunque es poco común el uso de starters que contengan cepas de BAL productoras de EPS en la elaboración de quesos, trabajos recientes han demostrado que cepas de *S. thermophilus* EPS⁺ pueden mejorar las propiedades funcionales de quesos Mozzarella parcialmente descremados o reducidos en grasa (Petersen y col., 2000).

I.1.4. Producción de compuestos antimicrobianos

La capacidad de las BAL de producir sustancias antimicrobianas ha sido utilizada históricamente para preservar alimentos. Se han utilizado distintos procesos de fermentación como una forma de conservación de una gran cantidad de alimentos como leche, vegetales, pescado y cereales.

El proceso de fermentación reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y da como resultado una serie de moléculas orgánicas de bajo peso molecular que exhiben actividad antimicrobiana, siendo las más comunes ácido láctico, ácido acético y ácido propiónico. Además de estos ácidos orgánicos, muchas BAL son capaces de producir otros componentes con propiedades antimicrobianas. No obstante, estas sustancias no son producidas para conveniencia del hombre, sino que tienen el propósito biológico de competir con otras bacterias que se desarrollan en el mismo entorno (Ouweland, 1998). Existe un interés comercial creciente en el uso de BAL como conservantes naturales de alimentos, cuyo objetivo es el de incrementar la estabilidad y la seguridad del producto. Este interés deriva de la preocupación de los consumidores por el uso de conservantes artificiales, y del aumento de la conciencia por la seguridad microbiológica de los alimentos (Earnshaw, 1992).

Los compuestos antimicrobianos más importantes producidos por las bacterias del ácido láctico son los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas.

- ◆ Ácidos orgánicos

Como se comentó anteriormente, los ácidos orgánicos producidos a partir de la fermentación de azúcares han sido históricamente los responsables de la preservación de la calidad de los alimentos fermentados. El producto mayoritario de estas fermentaciones por parte de las BAL es el **ácido láctico**, el cual produce cambios importantes de pH en el entorno donde éstas se desarrollan, cambios suficientes para inhibir muchos otros microorganismos presentes. La acción antibacteriana del ácido láctico es consecuencia, en gran medida, pero no en su totalidad, de la habilidad de

la forma no disociada de este ácido para penetrar en la membrana citoplasmática, lo que conduce a la reducción intracelular del pH y la interrupción del sistema de transporte de protones (Ray y Sandine, 1992). Estudios más recientes han revelado que las propiedades antimicrobianas del ácido láctico se deben no sólo a la disminución del pH, sino también a la capacidad permeabilizante de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, por lo que podría potenciar los efectos de otras sustancias antimicrobianas (Alakomi y col., 2000).

Existen otros ácidos producidos en menor proporción por numerosas BAL, como **ácido acético** y **ácido propiónico**. Estos ácidos poseen valores de pK_a superiores al del ácido láctico, por lo tanto se encuentran menos disociados que este último a un cierto pH, siendo mayor su poder antimicrobiano (Ouweland, 1998).

- ◆ Peróxido de hidrógeno

En presencia de oxígeno, algunas BAL tienen la capacidad de generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En estos casos, puede producirse una acumulación de peróxido de hidrógeno, porque estas bacterias no poseen catalasa, enzima que permitiría su degradación. Aún así, algunos autores argumentan que el peróxido de hidrógeno no se acumula en cantidades significativas *in vivo*, ya que es degradado por peroxidasas, flavoproteínas y pseudocatalasa (Ouweland, 1998).

El potencial del H_2O_2 producido por las bacterias lácticas en la conservación de alimentos se encuentra algo limitado. Existen muchos factores que deben ser ajustados, como la disponibilidad de oxígeno y la presencia de cantidades variables de superóxido dismutasa y catalasa. Además, la capacidad oxidante del H_2O_2 y de los radicales libres producidos a partir de éste, producen efectos importantes en la calidad sensorial del producto, causando rancidez de grasas y aceites, reacciones de decoloración y, bajo ciertas condiciones, liberación de aldehídos reactivos (Earnshaw, 1992).

Un segundo sistema de inhibición atribuido a las BAL y relacionado con la producción de H_2O_2 , es el sistema de la lactoperoxidasa (LPS). Para que este sistema sea eficiente, deben estar presentes en la leche ciertos componentes. La enzima

lactoperoxidasa reacciona con dos sustratos, el tiocianato y el peróxido de hidrógeno. Este último reacciona con el tiocianato en una reacción catalizada por la lactoperoxidasa, dando hipotiocianato como producto de oxidación, el cual posee capacidad de inhibir microorganismos (Mäyrä-Mäkinen y Brigret, 1998).

◆ Diacetilo

El diacetilo (2,3-butanodiona) es el compuesto responsable del aroma en la manteca. Es producido por varias especies y cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, y por otros microorganismos. Su formación no se produce si existe fermentación de hexosas, aunque puede producirse durante la metabolización del citrato, el cual es convertido en diacetilo por la vía del piruvato (Ouwehand, 1998).

◆ Bacteriocinas

Las bacteriocinas fueron definidas por Jacob y colaboradores en 1953 como “antibióticos de naturaleza proteica de peso molecular relativamente elevado, que en general actúan sobre bacterias de la misma especie, o sobre aquellas estrechamente relacionadas taxonómicamente” (Ouwehand, 1998). Está formado por un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas producidas por diferentes tipos de bacterias, y cuyo espectro, modo de acción y propiedades químicas son distintas (Mäyrä-Mäkinen y Brigret, 1998). Una primera clasificación está basada en el espectro de acción, dividiéndose en a) bacteriocinas que actúan sobre cepas relacionadas taxonómicamente, y b) bacteriocinas activas sobre especies no relacionadas. Las bacteriocinas del primer grupo beneficiarán el desarrollo de las bacterias que las producen si forman parte de un cultivo mixto, y pueden ser importantes en el control de las fermentaciones naturales o artesanales. Las bacteriocinas del segundo grupo podrían ser importantes para evitar el desarrollo de bacterias patógenas o contaminantes, de gran interés a la hora de asegurar la inocuidad de un producto. De acuerdo a su estructura, se han determinado cuatro clases de bacteriocinas producidas por BAL, Clase I, antibióticos; Clase II, péptidos pequeños moderadamente termoestables; Clase III, proteínas de gran tamaño termoestables; y Clase IV,

bacteriocinas complejas formadas por proteínas asociadas a lípidos o carbohidratos (Earnshaw, 1992; Desmazeaud, 1996; Ouwehand, 1998).

Una forma de distinguir las bacteriocinas de otros compuestos inhibidores producidos por las bacterias lácticas (H_2O_2 , ácidos láctico y acético) es neutralizando el sobrenadante de un cultivo y luego determinando la actividad en presencia y en ausencia de proteinasa y peptidasa, que inactivan a las bacteriocinas si están presentes (Desmazeaud, 1996).

1.2. Bacterias lácticas termófilas en la industria láctea fermentativa. Rol de *Lb. delbrueckii*

Como se describió anteriormente, las bacterias lácticas termófilas tienen una temperatura óptima de desarrollo entre 40°C y 50°C. Los cultivos termófilos forman parte de los starters utilizados en la industria láctea para la elaboración de leches fermentadas (como el yogur) y una gran variedad de quesos cuya elaboración implica altas temperaturas de cocción (Emmental, Gruyère, Comté, Grana, Mozzarella, Parmigiano). Las especies termófilas utilizadas en la industria láctea fermentativa son *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y *S. thermophilus*. Los lactobacilos termófilos sobreviven a las altas temperaturas de cocción y continúan produciendo acidez en la cuajada. La mayoría de los lactobacilos contribuyen en alguna medida al flavor a través de metabolitos producidos principalmente durante la maduración de los quesos (Curry y Crow, 2003). Algunos quesos duros argentinos, como el Reggianito Argentino, utilizan suerofermentos constituidos por una mezcla de cepas de *Lb. helveticus* (66%) y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (33%) (Reinheimer y col., 1996), mientras que los cultivos starters italianos están formados por las mismas especies bacterianas pero en proporción inversa (Bottazzi, 1998).

Muchas cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* producen galactosa a partir de la lactosa, y no son capaces de fermentarla. En quesos tipo suizo, la galactosa acumulada puede ser utilizada por las bacterias propiónicas adicionadas. Por lo tanto, los lactobacilos del cultivo starter contribuyen al

desarrollo de las propionibacterias durante la maduración de los quesos. La selección de cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (en presencia o no de *S. thermophilus*) deficientes en proteinasa o proteinasa positivas, puede aplicarse en la elaboración de queso Mozzarella para regular la tasa de producción de ácido, o propiedades funcionales, como elasticidad y fusión. El uso de cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* deficientes en proteinasa reduce el grado de pardeamiento durante la cocción de la masa casearia (Curry y Crow, 2003).

Además de ser ampliamente utilizado en la elaboración de distintos tipos de quesos, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* junto a *S. thermophilus* constituye los cultivos iniciadores en la producción de yogur. La combinación de estos cultivos potencia el crecimiento de ambos, y además de generar rápido desarrollo de acidez, contribuye a producir modificaciones a nivel de textura y flavor en el producto lácteo fermentado. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es más proteolítico que *S. thermophilus*, y en la leche se traduce en la producción de un amplio rango de aminoácidos a partir de la hidrólisis de la caseína. Los aminoácidos liberados estimulan el crecimiento de *S. thermophilus*. Por otra parte, el desarrollo de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en la leche es estimulado por el ácido fórmico y posiblemente dióxido de carbono y piruvato producidos por *S. thermophilus* (Craig y col., 1993; Frank y Hassan, 1998; Mäyrä-Mäkinen y Briget, 1998; Curry y Crow, 2003).

II. POTENCIALIDAD PROBIÓTICA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

II.1. Criterios de selección de microorganismos probióticos

El término "probiótico" fue acuñado por W. Kollath en 1954, según lo reportado en un artículo de la German Scientist Ferdinand Vergin. Según Kollath, los probióticos eran aquellas "sustancias activas esenciales para gozar de una vida saludable". La definición exacta de lo que hoy se conoce como probiótico se ha ido modificando a través del tiempo. En general, las definiciones más recientes se refieren a los mismos como "microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades suficientes ejercen un efecto benéfico sobre la salud" (Guarner y col., 2005)

Las bacterias probióticas pueden ejercer su influencia sobre la fisiología intestinal directa o indirectamente, a través de la modulación de la microflora intestinal o del sistema inmunológico (Van de Water, 2003).

La mayoría de los microorganismos considerados probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Lee y col., 1999; Saxelin, y col., 2003). De estos, los lactobacilos son los preferidos, tal vez por razones históricas, desde que el Profesor Elie Metchnikoff (Instituto Pasteur, París) propuso que los lactobacilos presentes en el yogur tenían un efecto positivo sobre la salud humana. Además, la forma más común de consumirlos es en alimentos lácteos fermentados, y en mucha menor medida en productos fermentados de origen vegetal y cárnico. En los últimos años se han propuesto otros microorganismos como potenciales probióticos, incluidas algunas levaduras (Ouwehand y col., 2002; Saxelin y col., 2003).

El **origen** de los microorganismos parece ser un factor importante, ya que las interacciones que se producen son específicas del huésped, es decir que si un probiótico va a ser consumido por el ser humano, debe ser aislado de intestino humano. Esto aumentaría las probabilidades de colonización del intestino. Sin embargo, este concepto está actualmente en revisión, pareciendo ser más importante la especie que el origen (Minelli y col., 2004; Bude Ugarte y col., 2006).

Los probióticos deben poseer **status GRAS** (Generally Recognized As Safe), es decir ser inocuos, seguros para la salud. Además, los potenciales probióticos deben poseer **buenas propiedades tecnológicas**, de tal manera que puedan ser desarrollados a escala industrial. Algunas cepas probióticas son suficientemente proteolíticas y desarrollan muy bien en leche, pero existen cepas que requieren de sustancias estimulantes, como monosacáridos u otras, para desarrollar en ese medio. El desarrollo de las bacterias probióticas en el ambiente intestinal puede favorecerse con sustancias conocidas generalmente con el nombre de *prebióticos*. Los prebióticos son ingredientes alimenticios no digeribles que afectan de forma benéfica al huésped por estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias en el colon. Una de las características principales de los prebióticos es que no pueden ser digeridas en el tracto gastrointestinal, ya que existe una incapacidad por parte de las enzimas digestivas para hidrolizar las uniones entre las unidades de

monosacáridos. Estos actúan mejorando la actividad microbiana y estimulando principalmente el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos (Saxelin y col., 2003).

Los microorganismos probióticos deben presentar, además, buena **resistencia a las barreras biológicas**, conservando su viabilidad frente a la acidez estomacal y la bilis presentes en el tracto digestivo (Ouwehand y col., 2002). Asimismo, deben existir estudios (tanto *in vitro* como *in vivo* en animales y humanos) que avalen las propiedades probióticas de la cepa en cuestión (Tabla 2).

Tabla 2. Requisitos a cumplir por un microorganismo probiótico.

-
- ★ Ser de origen humano (especificidad de especie)
 - ★ Ser inocuo (status GRAS)
 - ★ Poseer resistencia tecnológica
 - ★ Poseer resistencia a las barreras biológicas
 - ★ Poseer estudios clínicos que avalen su valor probiótico
-

Las especies pertenecientes al género *Lactobacillus* poseen, en general, buena resistencia al “estrés” *in vivo*, y dentro de este grupo, existen muchas cepas que presentan características tecnológicas adecuadas. Las bifidobacterias también son usadas frecuentemente, aunque en menor medida que los lactobacilos. Esto se debe a que son muy sensibles al oxígeno y poseen requerimientos nutricionales más estrictos, lo que dificulta, a veces, su uso a nivel industrial. El resto de las bacterias probióticas no son utilizadas en productos fermentados, sino en suplementos dietarios, cápsulas, polvos, etc. (Ouwehand y col., 2002). Las propiedades probióticas son específicas de cada cepa y no pueden extrapolarse a otras, por más que se encuentren estrechamente relacionadas (Servin y Coconnier, 2003; Bergonzelli y col., 2005).

La elección de un microorganismo probiótico está determinada por distintos factores (Tabla 3). En primer lugar, deben sobrevivir al pasaje por el tracto

gastrointestinal, lo que implica resistencia al pH ácido del estómago, bilis y enzimas pancreáticas (Tuomola y col., 2001; Guarner y col., 2005). La tolerancia a la acidez y a la bilis puede ser monitoreada fácilmente. Existen pruebas *in vitro* sencillas que sirven a estos fines; sin embargo, la extrapolación cuantitativa del desempeño *in vivo* se torna dificultosa (Tuomola y col., 2001). La tolerancia a la acidez es importante también para la supervivencia del probiótico en un alimento. Hasta el momento, los alimentos preferidos como vehículos para los probióticos siguen siendo las leches fermentadas, en las cuales el pH es relativamente bajo, y en consecuencia, los probióticos elegidos deben ser capaces de sobrevivir en este medio ácido.

La adhesión a la mucosa intestinal parece ser importante para la inmunomodulación, la exclusión de patógenos, la recuperación más rápida de la mucosa dañada y la colonización por un tiempo más prolongado (Ouwehand y col., 2002; Guarner y col., 2005). Sin embargo, a pesar de que ciertos trabajos han argumentado que el máximo efecto probiótico puede lograrse si los microorganismos se adhieren a las células de la mucosa intestinal, no existen evidencias irrefutables que demuestren que las bacterias probióticas administradas de forma exógena realmente se adhieren a las células intestinales. En vez de esto, las bacterias probióticas parecen llegar a las heces sin haberse adherido o multiplicado. Por lo tanto, para observar los efectos probióticos, estos microorganismos deben ser consumidos en forma periódica y constante (Servin y Coconnier, 2003; Van de Water, 2003).

En numerosos trastornos intestinales inflamatorios, el balance de la interacción microorganismo-huésped se ve alterado, y la inflamación se acompaña de un desequilibrio de la microflora intestinal. La normalización del balance de la microflora nativa puede darse a través del consumo de ciertos cultivos seleccionados. Esto constituye el fundamento de la terapia con probióticos. Las consecuencias positivas del consumo de probióticos se manifiestan a través de la corrección de la permeabilidad intestinal (la cual se ve aumentada en los trastornos inflamatorios del intestino), la normalización de la microecología intestinal alterada, el mejoramiento del sistema inmunológico y la disminución de la respuesta inflamatoria a nivel intestinal (Ouwehand y col., 2002). La inmunomodulación de la mucosa intestinal no es igual para todas las especies de bacterias probióticas (Perdigón y col., 1988b). Algunas de ellas son capaces de inducir la inmunidad secretoria específica (producción de

células IgA⁺, células CD4⁺ y anticuerpos específicos), mientras que otras aumentan la respuesta inflamatoria del intestino (producción de células IgA⁺ sin producción de células CD4⁺ ni anticuerpos) (Perdigón y col., 1998). El distinto comportamiento observado en las cepas sobre la respuesta inmune en la mucosa, especialmente en aquellas que inducen una respuesta inflamatoria, revela que no todas las bacterias probióticas pueden ser usadas como adyuvantes orales, y sus efectos benéficos no pueden atribuirse a todo un género o toda una especie bacteriana (Vintiñi y col., 2000).

En el intestino humano, la lactosa es hidrolizada por una enzima denominada lactasa. Cuando una persona que posee deficiencia en lactasa consume leche, pueden observarse algunos síntomas intestinales, lo que se conoce como "intolerancia a la lactosa" o mala digestión de lactosa. Todos los productos lácteos fermentados, especialmente el yogur y aquellos que poseen probióticos, **disminuyen los síntomas de la intolerancia a la lactosa**. Esto se explica por la presencia de β -galactosidasa en las bacterias que fermentan la leche. Luego de ser ingeridas, las bacterias presentes en el producto lácteo fermentado son lisadas por la bilis en el intestino delgado lo que produce la liberación de lactasa, la cual puede ahora ponerse en contacto con la lactosa y degradarla. Además, la viscosidad de las leches fermentadas es mayor a la de la leche fluida (sin fermentar), lo que provoca que el período de tránsito a través del aparato gastrointestinal sea más prolongado, y esto también contribuye a la mayor digestión de la lactosa. En general, este efecto benéfico está asociado a aquellos productos fermentados que contienen *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*. Algunos probióticos, como *Lb. rhamnosus* GG, no son capaces de fermentar la lactosa (Ouwehand y col., 2002; Saxelin y col., 2003; Van de Water, 2003).

La prevalencia de enfermedades alérgicas ha ido en aumento en los países desarrollados. Con la finalidad de explicar este fenómeno, se ha formulado lo que se conoce como la "hipótesis de la higiene". Según esta hipótesis, el aumento de las conductas de higiene ha conducido a una disminución del estímulo microbiológico, lo que resultó en un desequilibrio en el tipo de respuesta inmune, llevando al desarrollo de trastornos alérgicos mediados por la producción aumentada de Ig E (Ouwehand y col., 2002; Van de Water, 2003). La fuente más temprana y masiva de exposición a los microorganismos está asociada con el establecimiento de la microflora intestinal.

Tabla 3. Criterios a seguir para la selección de un microorganismo probiótico para la industria láctea fermentativa (Klaenhammer y Kullen, 1999; Ouwehand y col., 2002).

Criterios químicos y tecnológicos

- Propagación económica
- Viabilidad durante la propagación
- Resistencia a antibióticos
- Crecimiento en leche
- Interacciones con otras especies
- Resistencia al procesamiento y características del producto
- Estabilidad durante el almacenamiento del producto

Criterios biológicos

- Resistencia a la lisozima
- Resistencia a la acidez estomacal
- Resistencia a los ácidos biliares
- Estabilidad genética

Criterios probióticos

- Origen humano
 - Status GRAS
 - Producción de sustancias antimicrobianas
 - Actividad de β -galactosidasa
 - Propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas
 - Estimulación del sistema inmunológico
 - Actividad hipocolesterolémica
 - Deconjugación de ácidos biliares
 - Adherencia al epitelio intestinal
 - Capacidad de agregación
 - Producción de vitaminas
 - Producción de exopolisacáridos
-

Se han encontrado diferencias en la microecología intestinal de neonatos, las cuales se asociaron con el desarrollo de enfermedades alérgicas, encontrándose mayor cantidad de clostridios y menor número de bifidobacterias en los niños alérgicos que en aquellos que no habían desarrollado alergias (Kalliomaki y col., 2001).

Los probióticos han sido tradicionalmente usados para el **tratamiento de trastornos gastrointestinales**. Ciertas cepas probióticas son capaces de disminuir la duración de la gastroenteritis aguda de origen viral. *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. reuteri* SD2112, *Lb. casei* Shirota y *B. lactis* Bb12 han demostrado disminuir la duración de la diarrea producida por rotavirus en aproximadamente un día. Este efecto puede ser debido a la producción de IgA específica contra rotavirus, la reducción de la permeabilidad de la mucosa intestinal y la normalización de la composición de la microflora intestinal (Ouwehand y col., 2002).

Existen resultados alentadores respecto a la administración de probióticos en pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino y síndrome de intestino irritable, sobre todo cuando se administran mezclas de lactobacilos y bifidobacterias en vez de una sola cepa aislada (Bergonzelli y col., 2005).

El consumo de probióticos también se ha asociado a la erradicación del *Helicobacter pylori*, ayudando en la disminución del número de este patógeno en las poblaciones de riesgo, o como adyuvantes para contrarrestar los efectos secundarios observados en las terapias realizadas para combatirlo. Las personas que poseen gastritis asintomática en las cuales no se justifica la realización de tratamiento, se podrían beneficiar con una dieta que incluya probióticos. Esto ayudaría a manejar la infección, y por lo tanto a disminuir el riesgo de desarrollar las patologías asociadas (Bergonzelli y col., 2005).

Se han postulado muchos mecanismos por los cuales los probióticos pueden mejorar el bienestar del intestino. Estos mecanismos incluyen competencia por los nutrientes, inhibición de la adhesión e invasión de microorganismos patógenos, producción de sustancias antimicrobianas y/o estimulación de la inmunidad de la mucosa intestinal. Las bacteriocinas han despertado gran interés por su potencial como conservantes alimenticios y como agentes antibacterianos contra determinadas

infecciones causadas por bacterias patógenas Gram positivas. Sin embargo, la frecuencia de desórdenes gastrointestinales producidos por bacterias Gram positivas es relativamente bajo comparado con las producidas por bacterias Gram negativas o por rotavirus, los cuales son resistentes a la acción de las bacteriocinas (Servin y Coconnier, 2003). Más recientemente, se ha reportado que ciertas BAL producen sustancias antimicrobianas activas contra bacterias Gram negativas enterovirulentas. Se observó que el sobrenadante de células de *Lb. acidophilus* LB y *Lb. johnsonii* Lal estaba compuesto por sustancias antibacterianas activas contra un gran número de patógenos Gram negativos y positivos, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia cloacae*, pero inactiva contra especies normalmente encontradas en la flora intestinal tales como lactobacilos y bifidobacterias (Servin, 2004).

Estudios experimentales *in vitro* han revelado que ciertas cepas probióticas seleccionadas son efectivas contra bacterias diarreicogénicas. La producción de metabolitos como ácido láctico y ácido acético por parte de éstas, conduce a la disminución del pH. De esta manera, muchas cepas de *Lactobacillus* inhiben el desarrollo de bacterias patógenas. En algunos casos, la inhibición de los patógenos no es originada sólo por la disminución del pH, sino que puede resultar de la producción de sustancias que se liberan al medio y difunden en el mismo, como peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (van de Guchte y col., 2001), biosurfactantes (Velraeds y col., 1996) o bacteriocinas (Ouweland, 1998). Ciertas cepas de *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Bifidobacterium bifidum* han demostrado inhibir el desarrollo de aislados clínicos de *H. pylori* en estudios *in vitro*, propiedad que es parcialmente atribuida al ácido láctico.

En los últimos años, el estudio de los mecanismos fisiopatogénicos de las bacterias y virus enteropatógenos se están llevando a cabo usando cultivos de líneas celulares intestinales humanas que expresan varias características específicas de muchos de los fenotipos celulares del epitelio intestinal (Servin, 2004). Las dificultades implicadas en el estudio de la adhesión bacteriana *in vivo*, específicamente en humanos, condujo al desarrollo de estos modelos celulares *in vitro*, que facilitan la selección preliminar de cepas potencialmente adherentes (Collado y col., 2005). Estos

modelos celulares producen una monocapa de células confluentes que imita la barrera de células epiteliales del intestino humano, lo que permite estudiar los mecanismos por los cuales los microorganismos patógenos atraviesan el epitelio intestinal para producir una infección en el huésped y su posterior diseminación por el organismo. Los estudios *in vitro* que utilizan estas líneas celulares han permitido demostrar que las propiedades probióticas son realmente específicas de cada cepa (Servin y Coconnier, 2003). Algunas líneas celulares ampliamente utilizadas son HT-29 y Caco-2, así como sus clones HT-29-19A y Caco-2/TC-7, respectivamente (Servin, 2004).

La **capacidad de adhesión al epitelio intestinal** de los microorganismos es una de las características deseables para un microorganismo probiótico (Ouwehand y col., 2002; Schillinger y col., 2005). Es importante tanto para la colonización a nivel intestinal como para la modulación del sistema inmune a través del contacto con el tejido linfoide asociado al intestino. La capacidad de adhesión varía ampliamente entre las cepas probióticas conocidas. Las secreciones gástricas y las tecnologías de procesamiento también pueden modificar las propiedades de adhesión (Tuomola y col., 2000; Ouwehand y col., 2001). Algunas investigaciones demostraron que las propiedades de adhesión dependen de las condiciones de cultivo, el número de repiques realizados durante las fermentaciones a escala industrial, y el uso de crioprotectores durante el proceso de liofilizado de las cepas (Tuomola y col., 2001; Ouwehand y col., 2002). Se ha observado que los repiques efectuados durante un período superior a los 3 años produjo una disminución en la adhesión bacteriana. Asimismo, el cambio de medio de cultivo utilizado también podría ser causante de la disminución en las propiedades de adhesión. Ciertos estudios demostraron que determinados probióticos aislados de productos similares pero de países distintos revelaron propiedades de adhesión muy distintas (Ouwehand y col., 2002). Estas diferencias pueden afectar los efectos benéficos de una cepa probiótica (Tuomola y col., 2001). Al igual que otras propiedades probióticas, la capacidad de adhesión es específica de cada cepa (Servin y Coconnier, 2003).

La **hidrofobicidad bacteriana puede favorecer la colonización intestinal** y la adhesión de las bacterias sobre el epitelio intestinal. Sin embargo, se vio que ciertas cepas que tienen buenos niveles de adhesión poseen escasa hidrofobicidad superficial. Es por esto que la hidrofobicidad puede ser un factor útil que favorezca la

adhesión, pero no es un prerrequisito para que una cepa posea elevada capacidad de adhesión. La hidrofobicidad superficial es una de las propiedades fisicoquímicas que facilitan el primer contacto entre el microorganismo y las células huéspedes. Se trata de una interacción inicial inespecífica débil y reversible, y precede al proceso de adhesión posterior, el cual es mediado por mecanismos más específicos que involucran proteínas de la superficie celular y ácidos lipoteicoicos. Por lo tanto, la contribución de la hidrofobicidad a la capacidad de adhesión parecer ser limitada, lo que podría explicar la falta de correlación observada entre ambas en numerosos estudios (Schillinger y col., 2005).

La **viabilidad de los cultivos probióticos en los productos alimenticios** sería importante para que se produzcan los efectos benéficos sobre la salud, tal como ha sido evidenciado en la mayoría de los estudios clínicos llevados a cabo. Por otro lado, se han observado escasos efectos para cultivos probióticos no viables. Algunos trabajos refieren que la administración de lactobacilos viables produjo la activación de macrófagos, los cuales juegan un rol importante en la respuesta inmune del sistema de defensa del huésped (Perdigón y col., 1986). Sin embargo, no se han realizado demasiados estudios sobre cultivos probióticos no viables. Los microorganismos no viables podrían tener varias ventajas sobre los viables: los productos tendrían mayor tiempo de conservación (mayor shelf life), mayor seguridad, y no sería necesario que sean transportados ni almacenados bajo refrigeración. Ciertos estudios sugieren que los cultivos probióticos no viables también son capaces de provocar efectos positivos, reduciendo el tiempo de la diarrea producida por rotavirus y mejorando los síntomas de la intolerancia a la lactosa (Ouwehand y col., 2002).

II.2. Rol probiótico de *Lb. delbrueckii*

El consumo de yogur ha demostrado tener efectos beneficiosos en la salud del consumidor, y estos efectos parecen estar ligados a la presencia de bacterias lácticas viables. A pesar de que la probabilidad de que estas bacterias lácticas sean capaces de colonizar el intestino es bajo, igualmente producen un impacto en el bienestar del intestino. Muchos estudios han demostrado una mejoría en la digestión y absorción de

la lactosa en personas alimentadas con yogur que contenía bacterias viables, así como una reducción en los síntomas gastrointestinales (Van de Water, 2003).

El yogur también ha sido utilizado en el tratamiento de episodios de diarrea aguda. Muchas investigaciones revelaron que la administración de yogur contribuyó a disminuir la duración de estas diarreas producidas por rotavirus (Bergonzelli y col., 2005). Algunos trabajos han resaltado el rol del yogur en la respuesta inmune (Vintiñi y col., 2000; Perdigón y col., 2001; Perdigón y col., 2002; Van de Water, 2003), sobre todo en personas inmunocomprometidas, como es el caso de los ancianos. Asimismo, se observó que el consumo prolongado de yogur estuvo asociado a una disminución importante de los síntomas alérgicos (Guarner y col., 2005).

S. thermophilus y *Lb. bulgaricus* no son demasiado resistentes a la acidez gástrica ni a la bilis, y no parecen ser capaces de colonizar el intestino. Sin embargo, pueden producir un efecto beneficioso *in vivo* debido a sus enzimas intracelulares (β -galactosidasa), a los receptores antigénicos de la superficie celular, o a través de metabolitos liberados durante la fermentación (Van de Water, 2003). Es más, las bacterias presentes en las leches fermentadas han revelado la capacidad de inhibir bacterias patógenas *in vitro* mediante la producción de ácidos orgánicos y/o sustancias similares a los antibióticos (bacteriocinas). No obstante, esta interacción no ha sido demostrada fehacientemente *in vivo* (Garrote y col., 2000).

Debido a la escasa habilidad de sobrevivir al pasaje por el estómago y tracto gastrointestinal, las bacterias lácticas starters no son consideradas generalmente como microorganismos probióticos. Sin embargo, criterios más recientes han incluido a *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* en la lista de estos organismos. Estos criterios resaltan la capacidad de liberar, entre otros compuestos, enzimas (β -galactosidasa) que mejoran la digestión de nutrientes en el intestino y modulan la respuesta inmune, lo que también juega un papel positivo en la salud humana. De acuerdo a esto, el valor probiótico global de un producto lácteo fermentado debería ser tenido en cuenta no sólo por los cultivos probióticos adicionados, sino también por la contribución probiótica de la microflora acidoláctica del starter (Vinderola y Reinheimer, 2003).

La disminución en los niveles de colesterol sanguíneo de los mamíferos, estaría ligada a la actividad microbiana. A su vez, el metabolismo del colesterol está estrechamente relacionado con el de las sales biliares, siendo estas últimas la forma soluble de los productos de excreción derivados del colesterol. Las sales biliares pueden metabolizarse por medio de la actividad enzimática presente en ciertas bacterias durante la circulación enterohepática. La enzima BHS (bile-salt hidrolase) es la responsable de la deconjugación de los ácidos biliares. Algunas bacterias asociadas al tracto gastrointestinal poseen esta enzima (Lim y col., 2004). Gilliland y col. (1985) observaron que *Lb. acidophilus* redujo el nivel de colesterol sanguíneo a través de la hidrólisis directa del colesterol y por deconjugación de sales biliares.

Muchos cultivos usados en la elaboración de productos lácteos fermentados son sensibles a la acción de la bilis presente en el tracto gastrointestinal, impidiendo que éstos lleguen viables al intestino. Teniendo en cuenta lo expuesto, es interesante considerar la obtención de cepas con resistencia mejorada a bilis. Una cepa con buena resistencia a la bilis tendrá mayores posibilidades de llegar viable al intestino. En consecuencia, varios investigadores se han dedicado al aislamiento y estudio de derivados adaptados a bilis. La inhibición de ciertas bacterias por parte de sales biliares, puede ser revertida por medio de una adaptación progresiva de las cepas a concentraciones crecientes de estos compuestos (Margolles y col., 2003; Gueimonde y col., 2005). Las modificaciones sufridas por estos derivados adaptados a bilis respecto de las cepas originales fueron también determinadas: niveles de adhesión *in vitro* a mucus intestinal humano (Gueimonde y col., 2005), patrones de resistencia a los antibióticos (Noriega y col., 2005), perfiles de proteínas asociadas a membranas (Sánchez y col., 2004) y resistencia cruzada a otras sales biliares (Noriega y col., 2004).

Ciertos estudios han demostrado que *Lb. delbrueckii* fue la especie que presentó mejores características probióticas en relación a *S. thermophilus* y *Lactococcus lactis*. Esta especie fue resistente al jugo gástrico simulado y a la bilis, y reveló altos valores de actividad de β -galactosidasa. Por otro lado, al comparar las bacterias lácticas usadas en cultivos starters (*S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactococcus lactis*) con las cepas probióticas de *Lb. casei* estudiadas, se observaron valores de hidrofobicidad similares o superiores para las primeras. Por lo tanto, la contribución probiótica de las bacterias usadas como starter en una leche

fermentada debe ser tenida en cuenta, ya que su contribución podría ser muy interesante (Vinderola y Reinheimer, 2003).

Al igual que en el caso de las bacterias clásicamente conocidas como probióticas, se ha visto que ciertas cepas de *Lb. delbrueckii* son capaces de estimular el sistema inmunológico asociado al intestino. En general, el efecto estimulante depende de la dosis de cultivo administrada (Vintiñi y col., 2000; Perdigón y col., 2002). No todas las cepas poseen esta capacidad que, al igual que el resto de las propiedades probióticas, debe ser cuidadosamente evaluada para cada cepa en particular.

También se ha demostrado que los lactobacilos tienen la capacidad de ser utilizados como adyuvantes en las vacunas orales, ya que son responsables de mejorar la respuesta inmune del huésped (Perdigón y col., 1988a).

Asimismo, ciertos resultados sugieren que las BAL pueden jugar un rol importante en la prevención del cáncer de colon a través de influencia metabólica, inmunológica y protectora en el colon (Bergonzelli y col., 2005). Se demostró que las bacterias presentes en el yogur ejercen un efecto antitumoral a través de la estimulación del sistema inmune. En ratones inyectados con una sustancia carcinogénica, la administración de yogur por un período prolongado y continuo, inhibió la progresión y promoción del tumor a través de la modulación de la respuesta inmune y del estímulo de la apoptosis celular (Moreno de LeBlanc y Perdigón, 2004).

Como puede observarse, existen numerosos trabajos que demuestran las propiedades probióticas de bacterias lácticas no consideradas tradicionalmente como tales. En consecuencia, existen razones más que suficientes para pensar que *Lb. delbrueckii* debería ser considerada una bacteria con propiedades probióticas. Si una cepa determinada de *Lb. delbrueckii* posee adecuadas propiedades tecnológicas (buena capacidad acidificante y proteolítica), y al mismo tiempo características probióticas comprobadas, puede convertirse en un microorganismo extremadamente interesante. Además de ser utilizado en la industria láctea fermentativa como cultivo iniciador, podría incluirse en alimentos funcionales por sus características probióticas, produciendo efectos benéficos sobre la salud del consumidor.

III. LOS BACTERIOFAGOS

Los bacteriofagos, o “fagos”, son virus que infectan bacterias. Los fagos fueron los últimos de los tres grandes grupos de virus en ser descubiertos, precedidos por el descubrimiento de los virus que infectan plantas en 1892 y virus de animales en 1898. Como muchos de los grandes hallazgos de nuestra era, los fagos fueron descubiertos por casualidad. Fueron identificados a principios del siglo XX por el bacteriólogo británico Frederick W. Twort en 1915, y poco después por el bacteriólogo canadiense Felix D’Herelle en 1917. Ambos investigadores observaron pequeñas zonas más claras y simétricas a las que denominaron “placas”, sobre un césped de bacterias previamente inoculadas en un medio semi-agarizado (Sturino y Klaenhammer, 2004a). En 1936 se observó y comunicó el primer ataque fágico a una bacteria láctica (Neve, 1996).

Al igual que el resto de los virus, los fagos son incapaces de desarrollarse por sí mismos; en cambio crecen en forma parásita dentro de la célula bacteriana y se liberan luego de producir la lisis celular. Los fagos son específicos de un huésped y en general atacan sólo a cepas muy relacionadas entre sí (Neve, 1996; Heap y Harnett, 2003).

III.1. Fagos de bacterias lácticas

La función principal de los cultivos starters es la de producir ácido láctico en cantidades suficientes. En los productos lácteos fermentados, la actividad de las bacterias del starter puede verse retrasada por una variedad de sustancias inhibitorias presentes en la leche, como residuos de antibióticos, aglutininas, sustancias químicas, detergentes, desinfectantes, etc. Todos estos compuestos pueden causar el retraso parcial o total de la actividad de las bacterias afectadas. Sin embargo, los bacteriofagos constituyen el problema más grave que afecta las elaboraciones de productos lácteos fermentados (Josephsen y Neve, 1998).

La importancia tecnológica de las distintas subespecies de *Lb. delbrueckii* en la industria fermentativa ha sido extensamente demostrada y previamente detallada.

Como ya se describió, la infección fágica conduce a la inhibición parcial o total de la actividad acidificante de los cultivos implicados, derivando en pérdidas económicas importantes. Esta problemática ha ido creciendo en las últimas décadas debido al incremento de la producción de leches fermentadas y quesos que utilizan estas bacterias como parte de sus cultivos iniciadores. Sin embargo, la información acerca de fagos de *Lb. delbrueckii* no es muy abundante. Uno de los pocos bacteriofagos que fue ampliamente estudiado es el fago LL-H, lítico de la cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LL23 (Trautwetter y col., 1986; Vasala y col., 1995; Mikkonen y col., 1996; Ravin y col., 2006). Recientemente, fueron aislados y caracterizados los tres primeros fagos argentinos de *Lb. delbrueckii* (Quiberoni y col., 2003).

Para su multiplicación, los fagos necesitan utilizar la maquinaria metabólica de bacterias vivas (Heap y Harnett, 2003), liberándose luego de producir la lisis celular. Existen varias formas de clasificación de los fagos, de acuerdo al espectro de huéspedes, características de multiplicación (período de latencia, burst size o número de fagos liberados a partir de una célula infectada), morfología de las placas de lisis y morfología mediante el uso de microscopía electrónica, y perfil de proteínas (Neve, 1996). Los bacteriofagos más complejos presentan una estructura binaria, es decir, poseen una cabeza generalmente hexagonal, formada por el genoma del fago contenido dentro de una cápside, y una cola, de estructura helicoidal, que se une a los receptores que se encuentran en la superficie de las células bacterianas durante el inicio de una infección (Fig. 1). Existen varios criterios para clasificar a los fagos, dentro de los que se destacan el de Bradley (1967) y el de Ackermann y col. (1984). La clasificación de Bradley se basa principalmente en las características morfológicas de los fagos, dividiéndolos en 6 grupos (A, B, C, D, E y F) (Fig. 2). En la clasificación propuesta por Ackermann, los tres grupos básicos de Bradley (A, B y C) se organizan en las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*, respectivamente (Fig. 3).

Debido al riesgo económico que implican, el control de las infecciones fágicas resulta un factor crítico durante la manipulación de las bacterias usadas como cultivos starters. Este control debe estar orientado al estudio exhaustivo de los complejos y dinámicos mecanismos de la interacción fago-célula hospedadora, lo cual incluye la caracterización de la población fágica involucrada, el análisis de los sistemas naturales

de defensa bacteriana ante el ataque fágico, y la identificación de los sistemas de defensa propios de los fagos (Josephsen y Neve, 1998).

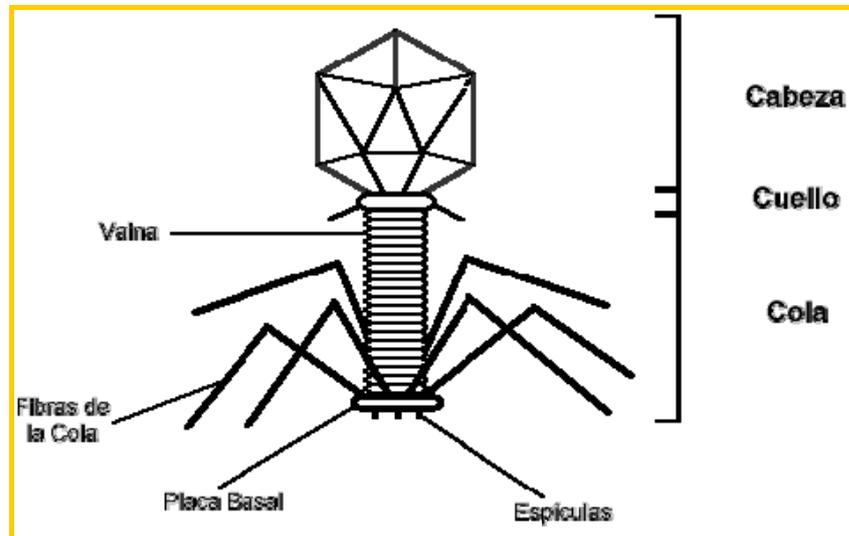


Fig. 1. Morfología básica de fagos de bacterias lácticas.

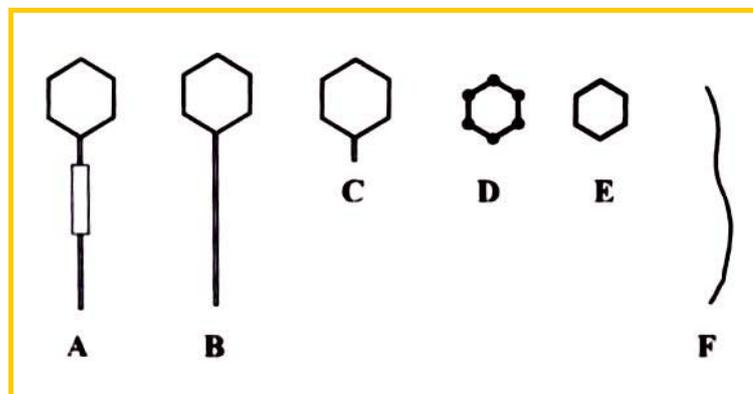


Fig. 2. Tipos morfológicos básicos de bacteriofagos, según Bradley (1967).

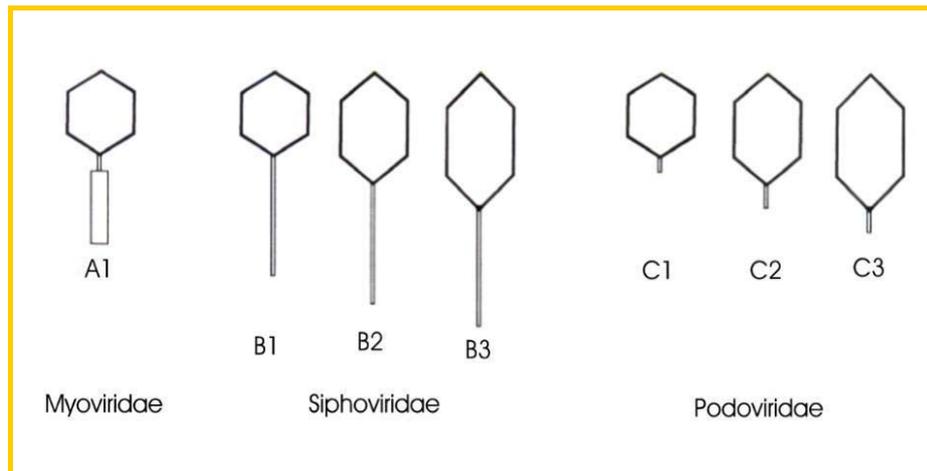


Fig. 3. Familias y morfotipos básicos de fagos de bacterias lácticas, según Ackermann y col. (1984).

III.2. Ciclo vital de un fago

Los fagos pueden existir fuera de la célula hospedadora, como partícula inerte a nivel metabólico y sin capacidad de formar nuevas partículas fágicas, o como parásito intracelular. Para iniciar la replicación fágica, un fago debe adsorberse a una célula bacteriana viable, a través de receptores específicos presentes en la pared celular.

Existen dos tipos de ciclos vitales posibles en un bacteriofago que infecta bacterias lácticas: lítico o lisogénico. En un ciclo lítico, la infección concluye con la lisis bacteriana y liberación de la progenie fágica. Estos fagos son denominados **líticos** o **virulentos**. Muchos de los fagos que generan problemas en la industria llevan a cabo este tipo de ciclo. Durante la infección lisogénica los fagos insertan su genoma en el cromosoma bacteriano. A estos fagos se los conoce como **profagos** o fagos **temperados** (Sturino y Klaenhammer, 2004a).

III.2.1. Ciclo lítico

El ciclo lítico consta de cinco pasos fundamentales: adsorción, inyección del ADN viral, síntesis de componentes fágicos, ensamblaje de las nuevas partículas fágicas y lisis de la célula bacteriana hospedadora. Se describirá brevemente cada una de estas etapas.

- ◆ Adsorción

Cuando un fago entra en contacto con una célula bacteriana susceptible, se adhiere a receptores específicos ubicados en la pared celular bacteriana. Los fagos se adsorben por medio de la cola, la cual puede poseer placa basal y estructuras adicionales (como fibras) que proporcionan estabilidad a esta unión. Se postuló que la adsorción consta de dos etapas, la primera reversible, y la segunda irreversible (Neve, 1996; Josephsen y Neve, 1998).

- ◆ Inyección del ADN fágico

Luego de la adsorción, el ADN fágico es inyectado desde la cabeza a través de la cola hacia el interior de la célula bacteriana, quedando en la superficie lo que se conoce como partícula fantasma, que no es otra cosa que la partícula fágica carente de ADN (Neve, 1996).

- ◆ Síntesis de componentes virales y ensamblaje de nuevas partículas fágicas

Una vez inyectado el ADN fágico, el metabolismo normal bacteriano se interrumpe y se dedica a la síntesis de los componentes necesarios para formar nuevas partículas fágicas. Las proteínas estructurales sintetizadas se ensamblan, y las nuevas moléculas de ADN fágico son empaquetadas en el interior de las cabezas, constituyéndose las nuevas partículas virales (Neve, 1996).

- ◆ Lisis bacteriana y liberación de la progenie fágica

Finalmente, se produce la lisis celular mediante la cual las nuevas partículas fágicas son liberadas al medio. La lisis bacteriana se produce por acción de dos enzimas denominadas holina y lisina, las cuales están codificadas en el genoma fágico (Sturino y Klaenhammer, 2004a).

Se define el *burst size* como el número total de nuevas partículas fágicas liberadas a partir de la infección (y lisis) de una célula bacteriana. Este parámetro es característico de cada sistema fago/ cepa sensible.

La Fig. 4 representa las etapas principales que se suceden durante el ciclo lítico de un bacteriofago.

III.2.2. Ciclo lisogénico

En este caso, la adsorción y la inyección del ADN viral van seguidas de la integración del ADN fágico en el cromosoma bacteriano (Fig. 5). La célula bacteriana es llamada entonces *lisógena*, y posee la capacidad de replicar la información genética del fago y de transmitirlo a toda su progenie bacteriana. El estado lisogénico se mantiene hasta que la cepa bacteriana es expuesta a algún tipo de estrés exógeno, produciéndose la inducción: el profago se separa del cromosoma bacteriano y retoma el ciclo lítico. En consecuencia, la progenie fágica es liberada y puede lisogenizar otras células bacterianas. Es por esto que si las cepas lisógenas son usadas a nivel industrial como parte de los cultivos starters, pueden acarrear problemas importantes, ya que representan una fuente inagotable de fagos. Sin embargo, actualmente se realizan pruebas necesarias para descartar la presencia de profagos sobre aquellas cepas útiles como son las utilizadas en los starters. Si una cepa lisógena en estudio presenta un gran potencial económico, podría obtenerse un derivado de ésta curado del profago (Sturino y Klaenhammer, 2004a).

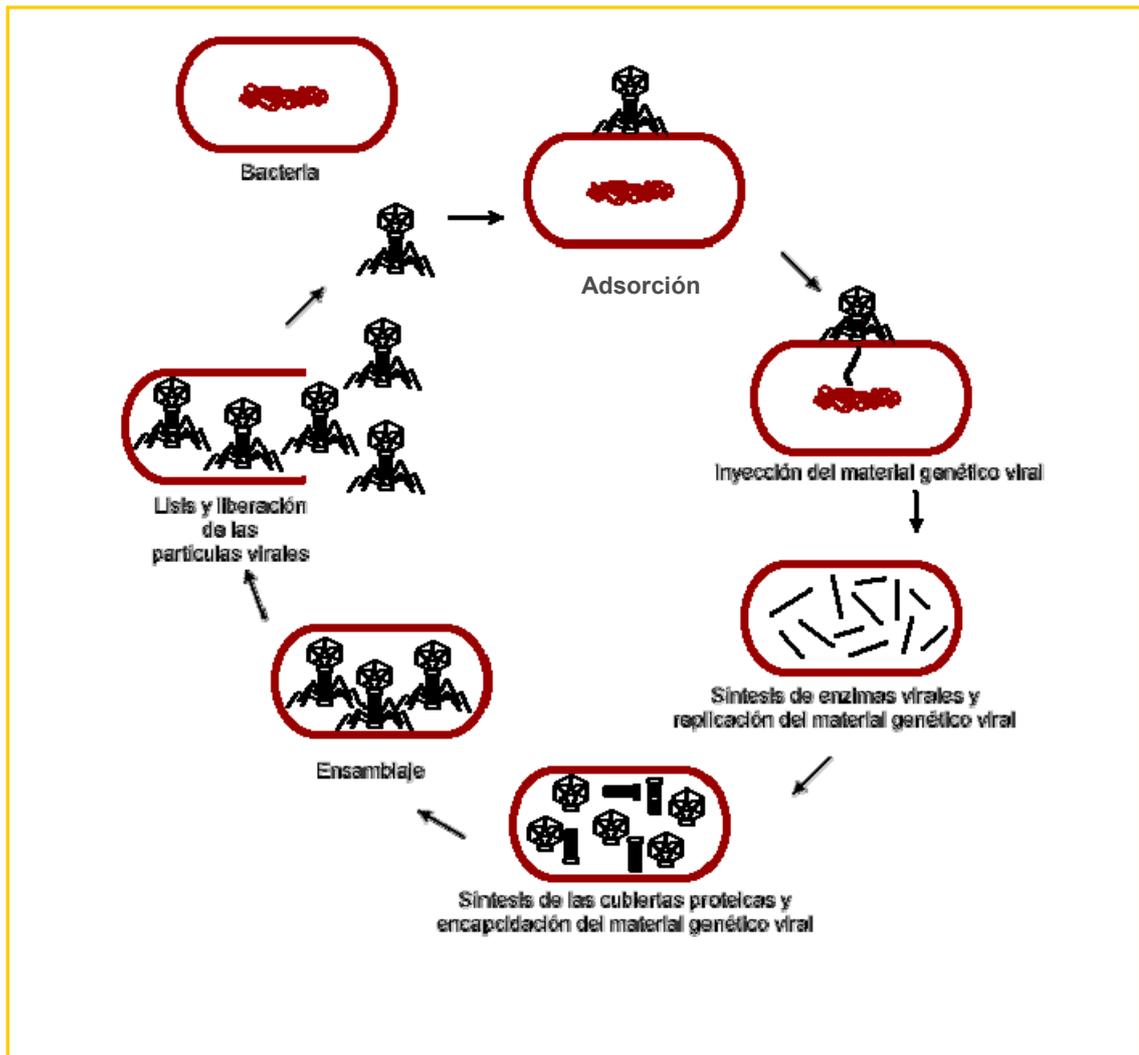


Fig. 4. Ciclo lítico de un bacteriofago.

III.4. Mecanismos de fagorresistencia

El ambiente lácteo ha demostrado ser un campo dinámico en el cual es posible estudiar las interacciones entre las bacterias lácticas y sus bacteriofagos. La persistencia de fagos en el mismo ambiente que las BAL ha permitido el desarrollo de diversos mecanismos de fagorresistencia por parte de estas últimas. La caracterización de estos mecanismos ha permitido a los investigadores comprender mejor la relación fago/cepa hospedadora. De esta forma, estos descubrimientos se han aprovechado para la obtención de cepas con fagorresistencia mejorada, pensando en un mejor desempeño a nivel industrial. En lactococos, los mecanismos de fagorresistencia están

generalmente codificados en plásmidos. En cambio, en *S. thermophilus* normalmente están codificados en el cromosoma bacteriano, existiendo pocos casos en los cuales esta información es transportada en plásmidos (Sturino y Klaenhammer, 2004a), al igual que para lactobacilos (de Los Reyes Gavilán y col., 1990). A continuación se describen brevemente los diferentes mecanismos de fagorresistencia en BAL.

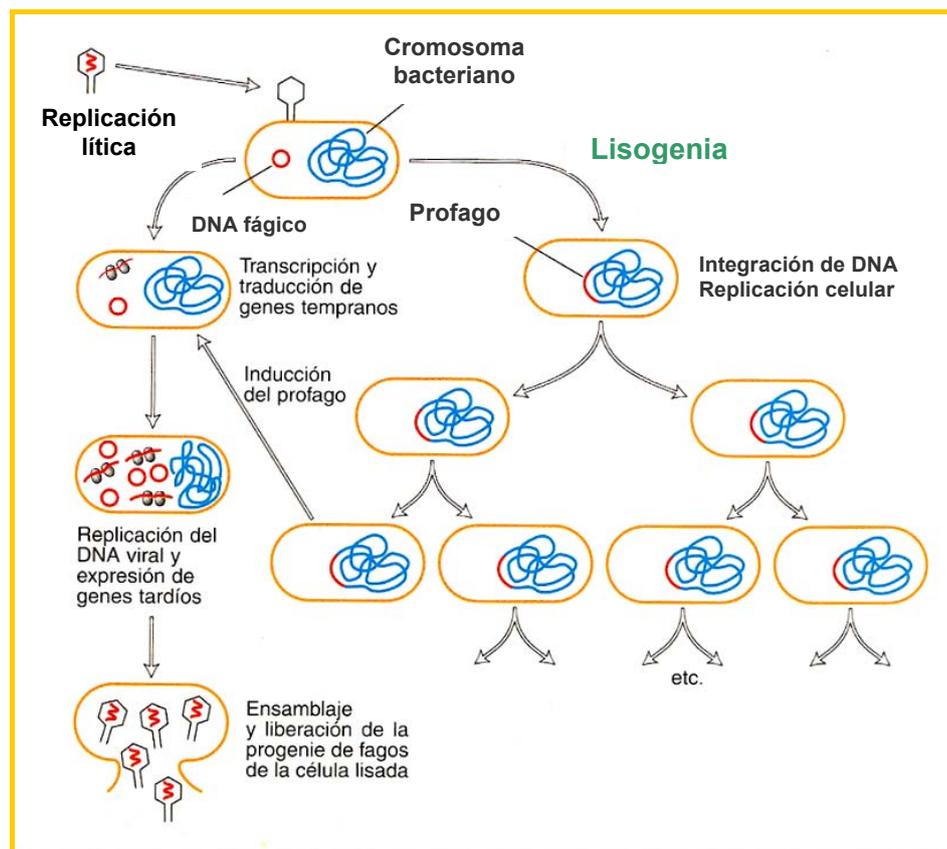


Fig. 5. Ciclo lisogénico de un fago y su relación con el ciclo lítico.

III.4.1. Bloqueo de la adsorción

La primera línea de defensa extracelular contra la infección fágica se basa en impedir que la partícula fágica se adsorba a la pared celular bacteriana. Así como ocurre en otros sistemas bacterianos, en lactococos la unión de los fagos a la célula hospedadora se realiza a través de la cola. Los receptores fágicos que existen en la superficie bacteriana pueden estar ubicados de manera azarosa o uniforme (Sturino y

Klaenhammer, 2004a). La inhibición de la adsorción puede derivar de la pérdida, alteración o enmascaramiento de los receptores ubicados en la superficie celular. El enmascaramiento de los receptores puede involucrar la expresión de sustancias extracelulares, como los exopolisacáridos, los cuales formarían algún tipo de "película protectora" sobre los receptores y los harían inaccesibles a los fagos (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Hill y col., 1996; Moineau y Lévesque, 2005). La pérdida parcial o total de los receptores fágicos expresados en la superficie bacteriana, puede deberse a mutaciones puntuales en el cromosoma bacteriano. El enmascaramiento de los receptores podría revertirse si se remueve/n la/s sustancia/s implicadas, pero si la fagoresistencia deriva de una modificación en el cromosoma no podrá revertirse el fenotipo (Hill y col., 1996).

III.4.2. Bloqueo de la inyección del ADN fágico

En algunos casos, la adsorción ocurre normalmente, pero el ADN fágico no es inyectado al interior de la célula. Es posible que esto represente un tipo específico de bloqueo de la adsorción, como la inhibición de la etapa irreversible de la adsorción, luego de la cual es inyectado el ADN fágico (Hill, 1993). En estos casos, el uso de microscopía electrónica permitió observar que el ADN viral permanecía en la cabeza del fago y no se revelaban las conocidas "partículas fantasmas" (Forde y Fitzgerald, 1999). Watanabe y col., (1984) describieron la obtención de un mutante de *Lb. casei* que permite la adsorción normal del fago PL-1, pero que aparentemente reprime la inyección del ADN viral. Por otro lado, Valyasevi y col. (1991) fueron capaces de aislar una variante fagoresistente de *Lc. lactis* subsp. *lactis* C2 que adsorbe al fago c2 en niveles normales, pero impide que el ciclo lítico continúe, debido a una falla en la inyección del ADN viral. Aparentemente, existe una proteína de membrana específica denominada *proteína de infección fágica* (PIP) que estaría implicada en este proceso. La sensibilidad fágica se recuperó cuando se introdujeron en la cepa los genes que codificaban para la proteína PIP.

III.4.3. Restricción-Modificación (R/M)

Luego de la adsorción fágica y la inyección del ADN viral, una bacteria que posea endonucleasas de restricción y metilasas de modificación, puede reconocer el ADN foráneo y degradar el genoma fágico a través de la acción de un sistema de restricción-modificación (R/M), que constituye la primera línea de defensa intracelular contra la infección fágica (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). Una de las grandes ventajas de los sistemas R/M es que detienen la infección antes que se inicie la cascada de eventos que concluyen en la muerte celular. En consecuencia, muchas células R/M⁺ infectadas continuarán siendo viables luego de la degradación del genoma fágico. Los sistemas R/M están compuestos de dos enzimas complementarias que actúan de manera coordinada, y distinguen entre el ADN exógeno (fágico) y el endógeno (bacteriano). La mayor parte del ADN fágico que ingresa a la célula bacteriana es digerido por una endonucleasa de restricción (ERasa) codificada en el cromosoma bacteriano. Para evitar que el propio ADN bacteriano sea atacado por esta endonucleasa, éste es modificado por acción de una metilasa (MTasa). De esta manera, el ADN bacteriano se protege de la autodegradación enzimática. Sin embargo, aquellas partículas fágicas que hayan eludido la acción de la endonucleasa, también serán modificadas por la metilasa. Así, el ADN viral no podrá ser reconocido como foráneo, no será degradado por la endonucleasa, y utilizará la maquinaria metabólica bacteriana hasta completar el ciclo lítico (Forde y Fitzgerald, 1999).

Los sistemas R/M conocidos hasta el momento se clasifican en cuatro tipos (I, II, III y IV). Esta clasificación se basa en 1) las secuencias de reconocimiento atacadas, 2) sitios de anclaje, y 3) la estructura de las enzimas. En los R/M tipo I, II y III, la MTasa se encarga de proteger el ADN bacteriano de la acción de la ERasa. Lo opuesto ocurre en los R/M tipo IV, en los cuales la MTasa actúa sobre el ADN que fue previamente modificado por la ERasa.

En bacterias lácticas usadas en la industria láctea fermentativa se han identificado hasta el momento sistemas R/M tipo I, II y III (Sturino y Klaenhammer, 2004a).

Los sistemas R/M proporcionan un beneficio adicional a nivel de la población bacteriana, ya que eliminan fagos líticos del medio ambiente, que de otra manera podrían infectar otros cultivos que no posean este tipo de protección (R/M⁻). Los R/M son herramientas muy poderosas, pero si se producen fallas en la acción de alguna de las enzimas que forman el sistema, se observarán las consecuencias no sólo en las células infectadas sino también en toda la población bacteriana. En ocasiones, parte del ADN viral escapa a la restricción y es metilado por la MTasa durante la replicación. Una vez modificado, se vuelve resistente a la acción de la ERasa y puede iniciar su multiplicación sin ningún impedimento. En consecuencia, la progenie fágica será modificada por la MTasa del hospedador por defecto. Una vez liberados, los fagos modificados podrán evadir los sistemas R/M de las células vecinas en las siguientes infecciones. Las probabilidades de evadir la restricción a través de la modificación del genoma dependerán del tipo de R/M y del número de sitios de restricción codificados en el genoma fágico. El valor de eficiencia de plaqueo (EOP = cociente entre el título fágico obtenido sobre el mutante fagorresistente y el título fágico obtenido sobre la cepa madre fago-sensible) de los fagos disminuye logarítmicamente a medida que el número de sitios aumenta en el genoma fágico. Por lo tanto, la eliminación de un solo sitio de reconocimiento de ERasa a través de una delección o mutación puntual puede aumentar dramáticamente las chances de un fago de evadir la ERasa (Sturino y Klaenhammer, 2004a).

En lactococos, la identificación, caracterización y sobre todo, la explotación de estos sistemas de defensa ha permitido extender la utilidad de muchas cepas de importancia industrial (Sing y Klaenhammer, 1993).

III.4.4. Infección Abortiva (Abi)

Si un fago evade un R/M, la infección abortiva (Abi) puede actuar como segunda línea de defensa intracelular. Los sistemas Abi actúan antes o después de la replicación del genoma, por lo que impiden el desarrollo intracelular del fago. En otras palabras, impiden la replicación del genoma fágico, la transcripción, la traducción, el empaquetamiento o el ensamblaje de las partículas fágicas (Garvey y col., 1995; Josephsen y Neve, 1998; Forde y Fitzgerald, 1999). Los mecanismos de fagorresistencia

mediados por Abi culminan con la muerte de la célula infectada, evitando de esta forma el desarrollo de la progenie fágica (Sturino y Klaenhammer, 2004a).

A diferencia de los sistemas R/M, los fagos que escapan a la acción de un sistema Abi no sufren modificaciones en su genoma, de modo que podrán ser detenidos en una próxima infección. Los sistemas Abi actúan con la misma intensidad tanto sobre la partícula fágica que originó la infección como sobre la progenie fágica (Hill, 1993).

Los sistemas Abi se ponen de manifiesto fenotípicamente a través de una disminución del EOP, una reducción de la eficiencia de los centros de infección (ECOI), y el desarrollo de placas más pequeñas, como consecuencia de un menor valor de burst size (progenie fágica reducida) (Hill, 1993; Forde y Fitzgerald, 1999). La mayoría de los sistemas Abi estudiados en lactococos están codificados en plásmidos, habiéndose encontrado pocos sistemas codificados en el cromosoma bacteriano (Forde y Fitzgerald, 1999).

III.4.5. Inmunidad lisogénica

Durante el proceso de lisogenia, el ADN viral inyectado al interior de la célula se integra al cromosoma bacteriano. Como resultado, no existirá lisis de la célula hospedadora, y el ADN fágico, llamado ahora *profago*, se replica simultáneamente al ADN bacteriano, dando origen a una progenie de células lisogénicas (Neve, 1996). El estudio de la lisogenia en bacterias lácticas es muy importante por varias razones. Desde el punto de vista práctico, las cepas lisogénicas podrían servir como reservorio de fagos líticos en las plantas industriales. Por otro lado, el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales se produce la interacción entre los genomas fágicos y bacterianos, y cómo se mantiene el estado de lisogenia podría proveer información invaluable sobre los sistemas de control génico presentes en estas bacterias. Los fagos temperados son capaces de mediar la transducción, la que además de transferir información contenida en plásmidos, podría tener una función en el desarrollo de mapas cromosomales para algunas BAL (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

El estado de lisogenia se prolongará hasta que el profago se libere espontáneamente, o bien sea inducido por algún tipo de estrés exógeno (antibióticos, irradiación UV, calentamiento). Así sea por liberación espontánea o inducida, el profago que se separe del cromosoma bacteriano podrá retomar el ciclo lítico. La progenie fágica que se libere de la célula bacteriana, puede lisogenizar a las células vecinas. Como resultado, los cultivos formados por cepas lisógenas pueden ser problemáticos si se usan industrialmente, porque representarán una fuente inagotable de fagos que pueden volverse virulentos y provocar problemas durante un proceso fermentativo (Garvey y col., 1995; Sturino y Klaenhammer, 2004a). Este hecho puede tener resultados fatales en un cultivo starter monocepa, ya que el fago tendría la posibilidad de infectar a toda la población bacteriana (Davidson y col., 1990).

Sin embargo, debe entenderse también que el estado lisogénico produce ventajas tanto para el fago como para el hospedador. Los fagos temperados pueden ayudar a proteger a las células hospedadoras de las infecciones producidas por otros fagos. En estos casos, la cepa lisógena podrá resistir la infección de aquellos fagos genéticamente similares al profago integrado (Neve, 1996; Josephsen y Neve, 1998; Guttman y col., 2005).

A pesar de que es posible que las cepas lisogénicas sean reservorios de fagos líticos, varios estudios de homología realizados entre fagos temperados y líticos han demostrado que los fagos más virulentos no están generalmente relacionados a fagos temperados (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). Esto podría sugerir que los fagos líticos no provienen habitualmente de cepas lisogénicas (Jarvis, 1989). No obstante, se ha observado cierta homología entre algunos fagos temperados y no temperados de *Lactobacillus*. Asimismo, el ADN de dos fagos temperados de *S. thermophilus* posee una extensa región de homología con el fago no temperado P55. Esta evidencia sugiere que al menos algunos fagos líticos son variantes de ciertos fagos temperados, nacidos por intercambio o recombinación de genes durante su evolución (Davidson y col., 1990).

III.4.6. Mecanismos de resistencia diseñados por ingeniería genética

Además de los mecanismos de fagorresistencia naturales existentes en las bacterias lácticas, se ha desarrollado una extensa variedad de mecanismos mediante el uso de ingeniería genética, cuyo objetivo ha sido la protección tanto contra fagos ya existentes como emergentes. En muchos casos, estos sistemas de defensa han sido probados en el laboratorio pero no fueron utilizados en la industria, debido a restricciones legales ligadas a un rechazo de los consumidores por los alimentos que contengan microorganismos manipulados genéticamente (Sturino y Klaenhammer, 2004a).

III.4.6.1. ARN antisentido (antisense RNA)

Este sistema puede ser usado para interferir con la multiplicación viral a través de la inhibición de la traducción de los genes codificados en fagos, que son necesarios para el proceso normal de multiplicación fágica. El ARN antisentido (*antisense*) se une a la hebra de ARN *sense* y crea una cadena doble hebra de ARN (ARNdc). La formación de este ARNdc inhibe la expresión de los genes mediante la acción conjunta de uno o más mecanismos intramoleculares. Por ejemplo, si el ARN *antisense* incluye secuencias complementarias al sitio de unión ribosomal (RBS, ribosome-binding site), entonces la formación del ARNdc podría enmascarar al RBS, impidiendo la unión adecuada del ribosoma, y reduciendo la traducción del gen en cuestión. La formación del ARNdc puede interferir también con el proceso de traducción, produciendo cierto impedimento estérico entre la interacción del ARNm y el ribosoma (Sturino y Klaenhammer, 2004b).

La acción del ARN *antisense* se visualiza mediante la reducción en los valores de EOP y menor tamaño de las placas de lisis (Hill, 1993; Josephsen y Neve, 1998). La expresión de los ARNs *antisense* retrasa la replicación del genoma fágico y limita significativamente el número de fagos liberados de una célula infectada. Esto indica que los ARNs *antisense* actúan interrumpiendo la infección fágica (Sturino y Klaenhammer, 2004a).

III.4.6.2. Per (Phage-encoded resistance)

Este sistema resulta de la presencia de un origen de replicación fágica (Φori) en un plásmido multicopia contenido en el interior de la célula hospedadora. Luego de la inyección del ADN fágico, comienza la replicación de este ADN viral. Sin embargo, en una célula hospedadora Per⁺, los factores de replicación fágica son reconocidos por el Φori multicopia presente en el plásmido, y se produce la replicación del plásmido en vez de la del ADN viral. La resistencia fágica se incrementa a medida que las copias del plásmido aumentan, lo que conduce a una disminución dramática en la replicación del ADN fágico (Hill, 1993, Sturino y Klaenhammer, 2004a).

III.4.6.3. Sistema suicida disparado por el fago (Phage-triggered suicide system)

Los sistemas suicida disparados por un fago promueven la expresión de un producto génico tóxico bajo el control de un promotor fago-inducible. Es un mecanismo altamente específico, descrito para *Lactococcus lactis* como una "trampa genética". Un promotor inducible por el fago es usado para activar la expresión de un sistema suicida que destruye simultáneamente al hospedador y a los fagos infectivos. Los genes letales consisten en un "cassette" de genes de restricción que fueron clonados sin su correspondiente metilasa, en plásmidos de alto número de copias (Djordjevic y col., 1997).

III.5. Estrategias para el control de los bacteriofagos

III.5.1. Problemática de la infección fágica en la industria láctea

La tecnología de elaboración de quesos y otros productos lácteos fermentados tiende a una mayor mecanización y acortamiento de los tiempos de fabricación. Esta evolución exige que los fermentos lácteos presenten características deseables que permanezcan constantes en condiciones de producción intensiva, y permitan obtener productos de calidad uniforme. El uso de cultivos seleccionados ha favorecido estos logros, pero se ha notado que suelen ser atacados por fagos que pueden hallarse circunstancialmente en el ambiente.

Los fagos se encuentran diseminados en el suelo, en la leche, en las aguas de lavado, en los productos y en el suero. Contaminan la maquinaria y utensilios y están presentes en los aerosoles que se forman y constituyen focos de infección, sobre todo cuando no son tomadas en cuenta las medidas higiénico-sanitarias adecuadas (Moineau y Lévesque, 2005).

El aumento en el volumen de la leche procesada durante las elaboraciones ocasiona una presión considerable sobre los sistemas de manipulación de los cultivos starters y dificulta la correcta limpieza de la planta, lo que conduce a un aumento en el riesgo de infecciones fágicas. En consecuencia, existe una necesidad constante de cultivos constituidos por cepas fagorresistentes, así como de implementar estrategias de protección de modo tal de preservar la calidad de los productos elaborados. A pesar de los avances logrados en este aspecto, la infección de los cultivos starters por parte de bacteriofagos continúa siendo un problema significativo para la industria láctea fermentativa (Boucher y Moineau, 2001; Heap y Harnett, 2003).

El problema persiste porque la leche cruda es una fuente constante de fagos y por la existencia de cepas lisógenas (Bruttin y col., 1997). Asimismo, los fagos son capaces de evolucionar y sortear los mecanismos naturales de fagorresistencia bacteriana a través de mutaciones y recombinaciones (Sturino y Klaenhammer, 2004a). Es por esto que se vuelve imprescindible implementar diferentes medidas de control de tal forma de cubrir la mayoría de los puntos críticos de entrada de fagos.

III.5.2. Medios inhibidores de fagos

Muchas veces el cultivo starter debe ser propagado antes de ser inoculado en la tina de fermentación. Este paso se realiza en un sistema cerrado donde, sin embargo, en ocasiones se pueden producir ataques por fagos. Una forma de minimizar este problema fue el desarrollo de medios inhibidores de fagos. Estos medios, además de ser ricos en nutrientes para las cepas del starter, contienen fosfatos, citratos u otros compuestos que actúan como secuestrantes de cationes divalentes, particularmente del calcio. Cuando el calcio no está disponible, se inhibe la proliferación de la mayoría, pero no de todos los bacteriofagos, ya que este catión es

necesario para que se lleve a cabo una adsorción eficaz. La efectividad de estos medios inhibidores depende del tipo y concentración de los compuestos quelantes, del pH del medio, y de los requerimientos específicos de la interacción fago-cepa sensible (Klaenhammer, 1984).

A pesar de que estos medios impiden la adsorción de los fagos, y por consiguiente su proliferación, esta situación se ve modificada una vez que los cultivos starters son adicionados a la tina de fermentación.

III.5.3. Tratamientos térmicos

Una de las principales vías de entrada de fagos a las plantas lácteas es la leche cruda usada para la elaboración de quesos y leches fermentadas. La leche que es conservada sin una refrigeración adecuada por largos períodos de tiempo, permitirá el desarrollo de la carga bacteriana, y también de los fagos que se propaguen sobre las bacterias presentes en la leche cruda. Esto podría afectar la posterior actividad de los cultivos iniciadores (Heap y Harnett, 2003).

Desde hace años se emplea el proceso de pasteurización para eliminar la carga bacteriana no deseada en leche destinada a la elaboración de quesos y otros productos lácteos. En un principio se realizaba el tratamiento a 62°C por 30 min, y en la actualidad es más usual el calentamiento a 72°C durante 15 seg (pasteurización alta). Estas condiciones no garantizan siempre la destrucción total de los fagos, lo que depende entre otras razones, de su concentración y de la presencia de sustancias protectoras propias de la leche. Es más, muchos quesos son elaborados utilizando leche cruda, la cual no es sometida a ningún tipo de tratamiento térmico (Josephsen y Neve, 1998).

Para la eliminación térmica de los fagos, algunos autores recomiendan realizar un tratamiento de 85°C durante 30 min del medio en el cual será propagado posteriormente el cultivo iniciador (Neve, 1996). Numerosos fagos no son destruidos por los tratamientos térmicos habituales, y la pasteurización puede dejar partículas virales viables en la leche (Suárez y Reinheimer, 2002). Un ejemplo claro es el caso del fago

lb₃, lítico de *Lb. delbrueckii* lb₃. Este fago demostró poseer una marcada resistencia térmica, pudiendo ser inactivado completamente sólo luego de un tratamiento a 72°C durante 45 min, o a 90°C durante 15 min (Quiberoni y col., 2003). Estas condiciones de tiempo/temperatura son más energéticas que aquellas usadas habitualmente en la industria láctea fermentativa para pasteurizar la leche. Otros estudios han reportado que la resistencia térmica de los fagos es variable, pero coinciden en que el tratamiento más efectivo para su total inactivación es calentar a 90°C durante 5 min (Quiberoni y col., 1999; Binetti y Reinheimer, 2000). Afortunadamente, ciertos fagos parecen ser algo más sensibles, pudiendo ser inactivados completamente (reducción de 6 órdenes logarítmicos) con tratamientos a 72°C durante 15 min (Capra y col., 2004).

III.5.4. Tratamientos químicos. Limpieza y desinfección del ambiente industrial

Como se dijo, muchos fagos no son inactivados durante el tratamiento térmico de la leche, y aquellos que sobreviven son capaces de infectar y lisar cepas del cultivo starter. Por lo tanto, el control de bacteriofagos debe estar basado en una serie de medidas que, implementadas en conjunto, puedan conducir a un control más efectivo de los fagos. Un régimen adecuado de limpieza y desinfección de equipos y utensilios usados durante la elaboración es fundamental para el mantenimiento de niveles bajos de bacteriofagos. El ácido peracético (0,15%) ha demostrado ser el biocida más efectivo, produciendo inactivación de las partículas fágicas rápidamente (Quiberoni y col, 1999; 2003; Binetti y Reinheimer, 2000; Suárez y Reinheimer, 2002; Capra y col., 2004). El ácido peracético parece actuar alterando el ácido nucleico y la estructura del fago (Maillard, 1996). Luego de reaccionar con la materia orgánica, este biocida se descompone liberando oxígeno y ácido acético o sus sales, por lo que no deja residuos (Shröder, 1984). Por otro lado, el hipoclorito de sodio demostró asimismo una alta efectividad sobre gran variedad de fagos, provocando la inactivación de fagos de *Lactococcus lactis* (a una concentración de 100-300 ppm) (Suárez y Reinheimer, 2002), *S. thermophilus* (100 ppm) (Binetti y Reinheimer, 2000); *Lb. helveticus* (100 ppm) (Quiberoni y col., 1999) y *Lb. paracasei* (800 ppm) (Capra y col., 2004). En el caso del fago lb₃ lítico de *Lb. delbrueckii* lb₃, fue necesaria una mayor concentración de este biocida (1200 ppm) (Quiberoni y col., 2003). El etanol y el

isopropanol son usados para la limpieza de superficies y utensilios de laboratorio (Neve, 1996), siendo menos efectivos para la inactivación de las partículas virales (Binetti y Reinheimer, 2000; Quiberoni y col., 2003; Capra y col., 2004).

En las industrias, existe un programa de limpieza "in situ" donde se utilizan soluciones cloradas (como el hipoclorito de sodio). El lavado de la tina debe realizarse apenas 5 min antes de que la leche sea introducida en ella. Luego, la solución clorada debe drenarse pero sin enjuagarse con agua. Todas las tuberías y equipamiento deben incluirse en un circuito de limpieza separado del utilizado para las líneas de propagación de los cultivos. No debe existir acumulación de residuos en el equipamiento y todas las válvulas deben ser fáciles de desarmar y limpiar (Heap y Harnett, 2003).

III.5.5. Cultivos de inoculación directa

En una planta de quesería, la diseminación de los fagos puede verse facilitada por el manejo inadecuado del suero y los aerosoles resultantes pueden contaminar los equipos de fermentación. Muchas industrias utilizan fermentos que deben ser propagados antes de ser agregados a la tina de elaboración, de manera de alcanzar niveles celulares adecuados. Si se contamina el ambiente donde es propagado el fermento, los fagos pueden atacar y lisar alguna de las cepas del starter, conduciendo a la obtención de un producto con pH elevado y alto contenido de lactosa. Una forma de evitar la etapa previa de propagación se basa en la inoculación directa de los cultivos o DVI (Direct Vat Inoculation). Estos se agregan directamente a la tina de elaboración, ya que su contenido celular es muy elevado y no necesitan propagaciones previas. Estos fermentos pueden adquirirse congelados o deshidratados. Los fermentos congelados son altamente activos, pero su almacenamiento a tan bajas temperaturas (-70°C a -196°C) y su distribución resultan muy costosos (Klaenhammer, 1984).

III.5.6. Cultivos monocepa, multicepa y rotación de cultivos

Cuando un fermento está compuesto por una única cepa, la aparición de un fago lítico conducirá con seguridad a la inhibición de sus capacidades acidificante y proteolítica. Por esta razón, el uso de fermentos monocepa no es la opción más recomendable.

Los cultivos multicepa pueden poseer una composición incierta o perfectamente conocida. Los fermentos naturales están formados por una variedad de cepas de las cuales en general sólo se conoce su composición aproximada. Estos fermentos tienen la ventaja de que si se produce el ataque fágico de alguna de las cepas que lo componen, el resto de las cepas presentes continuará su actividad normal, no produciéndose cambios visibles en la actividad general del fermento. Por lo tanto, se produce un equilibrio dinámico en el cual se van seleccionando naturalmente las cepas fagorresistentes, que van reemplazando a aquellas sensibles a fagos. Sin embargo, la actividad de estos fermentos no es uniforme, conduciendo a la obtención de productos de calidad variable. Actualmente, para los alimentos lácteos fermentados, las exigencias de calidad y uniformidad son mayores, por lo que se prefiere el uso de fermentos multicepa de composición definida (fermentos seleccionados). Los fermentos seleccionados están formados por 2 a 5 cepas (perfectamente caracterizadas), resistentes a distintos tipos de fagos y de gran calidad a nivel tecnológico (Sturino y Klaenhammer, 2004a). Si se detecta un fago lítico para una de las cepas que componen el fermento, puede ser reemplazada por una nueva cepa (Klaenhammer, 1984).

Una vez que el cultivo starter es adicionado a la tina de elaboración, las cepas que lo componen ya no estarán protegidas del ataque fágico. No es posible eliminar totalmente los fagos del ambiente, pero sí es factible mantenerlos en niveles bajos, de manera tal de evitar proliferaciones fágicas excesivas que conduzcan a la inhibición total de la actividad de los cultivos lácticos. Además de realizar una correcta limpieza del ambiente industrial, puede adicionarse el uso de un sistema de rotación de cultivos. En general, se seleccionan grupos de 2 a 4 cepas con propiedades tecnológicas adecuadas y con sensibilidad a diferentes tipos de fagos, y se las utiliza durante 4-5 días seguidos. Transcurrido este tiempo, se reemplazan por otro grupo de

cepas, y de esta forma, se van alternando varios grupos de cepas. Este sistema fue propuesto originalmente por Whitehead en 1953, con el objetivo de reducir los niveles de fagos en una planta. Sin embargo, no resulta tan sencillo obtener cepas que posean características tecnológicas adecuadas y que no estén relacionadas en cuanto a su sensibilidad fágica. Por otro lado, el uso de gran cantidad de cepas genéticamente distintas puede favorecer la aparición de una población fágica más heterogénea, pudiendo aumentar el número de recombinaciones genéticas dentro del pool de fagos de la planta (Moineau, 1999).

Klaenhammer y col. (1997) reportaron una innovación al sistema de rotación tradicional. En este caso, se utilizaron cepas isogénicas (con igual genoma), a las cuales les fueron introducidos una serie de plásmidos que codificaban para distintos sistemas de fagorresistencia. En teoría, la presencia de distintos tipos de sistemas de fagorresistencia dentro de las cepas isogénicas debería limitar la aparición de nuevos fagos, y disminuir la diversidad de la población de fagos existente en una determinada planta. Esto podría asegurar, además, la calidad constante del producto elaborado (Moineau, 1999).

Una alternativa útil se basa en alternar tecnologías de elaboración distintas en la misma planta. Por ejemplo, la elaboración de queso Cheddar (que utiliza cultivos mesófilos) puede ser alternada con la producción de queso Mozzarella, que utiliza cultivos termófilos. De esta forma, los fagos propagados en los cultivos mesófilos no podrán continuar con su multiplicación durante la elaboración de queso Mozzarella (Moineau y Lévesque, 2005).

III.5.7. Obtención de cepas con resistencia fágica mejorada

La identificación de los fagos puede ser de utilidad cuando se necesita reemplazar alguna cepa del starter, proyectar la rotación de cultivos y obtener cepas fagorresistentes. El desarrollo y estudio de una cepa determinada es un proceso largo y costoso, para el cual se utilizan distintos criterios que permiten seleccionar las cepas más adecuadas a nivel tecnológico. Una vez realizada la selección, esta cepa será utilizada para procesos industriales. Tarde o temprano, alguna de estas cepas puede

ser atacada por fagos, derivando en su remoción temporal o definitiva. Con el objetivo de prolongar la vida útil de estos cultivos, los microbiólogos se han concentrado por años en buscar alternativas para obtener cepas resistentes a fagos a partir de cepas sensibles (Boucher y Moineau, 2001).

III.5.7. 1. Mutantes espontáneos

El aislamiento de mutantes fagorresistentes resulta, en general, en una de las opciones más simples para obtener derivados resistentes a fagos a partir de una cepa fago-sensible. Estos mutantes se obtienen mediante una exposición prolongada de la cepa sensible a un fago lítico de la misma. Así, sobrevivirá sólo una pequeña fracción de la población celular, y será aquella insensible al ataque fágico. En muchos casos, esta resistencia deriva de una interferencia en la adsorción, debida posiblemente a una mutación espontánea en los genes que codifican para la formación de los receptores fágicos ubicados en la superficie de las células sensibles (Moineau y Lévesque, 2005). También pueden sufrir alteraciones en su composición de carbohidratos, perfil de proteínas o en la concentración de ácido lipoteicoico, lo que conduce a modificaciones en la superficie celular (Forde y Fitzgerald, 1999). El análisis de los mutantes fagorresistentes ha facilitado el estudio de los receptores fágicos involucrados en la adsorción. Sin embargo, se torna dificultoso localizar el/los gen/es modificado/s, los cuales pueden estar ubicados en cualquier lugar del cromosoma bacteriano (Sturino y Klaenhammer, 2004a).

En algunos casos esta propiedad puede estar presente en plásmidos (Sanders y Klaenhammer, 1983). Estos plásmidos pueden codificar para la síntesis de antígenos de superficie o mediar la producción de sustancias extracelulares que enmascaren los receptores ubicados en la superficie bacteriana, impidiendo que los fagos tengan acceso a ellos (Forde y Fitzgerald, 1999).

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. Es por esto que debe estudiarse la eficiencia de plaqueo o eficiencia de protección (EOP = cociente entre el título fágico obtenido sobre el mutante fagorresistente y el título fágico obtenido

sobre la cepa madre fago-sensible), realizándolo para los grupos más importantes de fagos. Los valores de EOP de un mecanismo de fagorresistencia fuerte estarán en un rango de 10^{-7} a 10^{-9} , donde 10^{-9} corresponde al valor máximo que es posible medir a través de las técnicas de laboratorio. Un valor de EOP de entre 10^{-4} y 10^{-6} corresponde a un sistema de fagorresistencia moderado, mientras que un valor entre 10^{-1} y 10^{-3} se relaciona a mecanismos de fagorresistencia débiles. Los mutantes que posean mecanismos de fagorresistencia fuertes o moderados serán los elegidos por la industria, ya que los mecanismos débiles podrían ofrecer una protección insuficiente contra el ataque fágico (Moineau, 1999). Existe otro ensayo que permite controlar la eficiencia de un mecanismo de fagorresistencia presente en una cepa: se hace desarrollar a la cepa en estudio (en presencia de fagos) en un sistema que imita las variaciones de temperaturas sufridas durante el proceso de fermentación realizado a escala industrial. Si esta cepa desarrolla normalmente en presencia de una concentración fágica inicial elevada ($> 10^6$ UFC/ml), es muy probable que sea "inmune" a las infecciones fágicas durante su desempeño a nivel industrial. Los mecanismos de fagorresistencia pueden estar influenciados por la temperatura, y algunos de ellos son menos efectivos a altas temperaturas ($> 37^{\circ}\text{C}$). Es por esto que el tipo de proceso fermentativo que se lleve a cabo también debe ser tenido en cuenta cuando se estudia la eficacia global de un determinado mecanismo de fagorresistencia (Moineau y Lévesque, 2005).

Aunque la obtención de mutantes espontáneos es relativamente simple, existen ciertas desventajas, como una alta frecuencia de reversión del fenotipo de fagorresistencia, resistencia limitada a unos pocos fagos relacionados (estrecho rango de especificidad fágica), menor tasa de crecimiento, o menor capacidad acidificante y/o proteolítica (Boucher y Moineau, 2001; Sturino y Klaenhammer, 2004a). La inestabilidad del fenotipo fagorresistencia puede conducir al desarrollo de cultivos constituidos por una mezcla de células fago-sensibles y células fagorresistentes. Aquellas células que sean fagorresistentes por un mecanismo de interferencia en la adsorción estarán protegidas del ataque fágico. No obstante, las partículas fágicas no serán eliminadas ni destruidas y permanecerán viables en el ambiente, por lo que podrán infectar a las células sensibles que encuentren a su paso. La persistencia de los bacteriofagos en cultivos fagorresistentes puede promover la pseudolisogenia o el "estado portador de fagos" (phage-carrier state), en el cual coexisten en un mismo cultivo tanto bacterias como fagos líticos (Forde y Fitzgerald, 1999). Aún así, muchos de

los mutantes aislados fueron usados exitosamente a nivel industrial (Quiberoni y Reinheimer, 1999; Moineau y Lévesque, 2005).

Se ha descrito el aislamiento de mutantes fagorresistentes de *Lb. helveticus* (Quiberoni y Reinheimer, 1999) y de *S. thermophilus* (Binetti, 2001; Viscardi y col., 2003). Sin embargo, no existen datos sobre el aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes de *Lb. delbrueckii*, lo que se considera de gran importancia ya que esta especie forma parte de cultivos iniciadores utilizados en la elaboración de leches fermentadas y ciertos tipos de quesos. Además, existen muchos estudios que remarcan sus propiedades probióticas (Perdigón y col., 2002; Van de Water, 2003; Moreno de LeBlanc y Perdigón, 2004). Por todo lo expuesto, las variantes aisladas a partir de cepas de *Lb. delbrueckii*, además de presentar fagorresistencia mejorada y buenas características tecnológicas, podrían conservar o aún mejorar las propiedades probióticas de las cepas madres, convirtiéndose en derivados muy interesantes por los beneficios adicionales sobre la salud del consumidor.

III.5.7. 2. Transconjugantes

Desde que los sistemas de fagorresistencia codificados en plásmidos fueron descubiertos en lactococos, los cultivos starters se volvieron candidatos ideales para mejorar sus propiedades de resistencia a fagos mediante el uso de técnicas genéticas. Muchos de estos plásmidos son conjugativos, es decir que son capaces de mediar su propia transferencia. Por esto, la conjugación es una técnica adecuada para transferir plásmidos portadores de genes que codifiquen mecanismos de fagorresistencia a cepas con buenas características tecnológicas pero que carecían de sistemas de defensa adecuados contra el ataque fágico (Neve, 1996). Las nuevas cepas obtenidas de esta manera tienen calidad "food grade", ya que se explota un mecanismo de transferencia de genes utilizado naturalmente por las bacterias (Garvey y col., 1995). Estos sistemas de fagorresistencia naturales son generalmente efectivos contra varios grupos de fagos (Moineau, 1999).

Aunque la introducción de un mecanismo de fagorresistencia parece ser sencillo, los estudios realizados para mejorar cepas comerciales de *Lactococcus* demuestran que eso no es tan cierto. En primer lugar, muchas cepas son refractarias a

la adquisición de ADN extraño. Por otro lado, muchos plásmidos codifican otras propiedades (capacidad acidificante, producción de bacteriocinas, proteinasas) además de los sistemas de fagorresistencia, y pueden traer problemas en la práctica. También puede existir incompatibilidad entre los plásmidos. Así, la introducción de nuevos plásmidos puede generar pérdida de otros ya existentes, que codifiquen para propiedades fundamentales como actividad acidificante y proteolítica. Además, se debe controlar la estabilidad de los nuevos plásmidos, ya que es posible que se pierdan con el uso continuado de la cepa (Moineau, 1999).

III.5.7. 3. Cepas modificadas genéticamente

El conocimiento cada vez mayor del genoma de los fagos ha permitido el desarrollo de cepas resistentes a fagos a través de varias metodologías: Phage-encoded resistance (Per) y el uso de ARNm antisentido (antisense) (Hill y col., 1996), ya descritos con mayor detalle en la Sección III.4.6. Estas técnicas son altamente efectivas, aunque parecen tener un espectro de resistencia mucho más acotado que los sistemas de defensa naturales (Josephsen y Neve, 1998; Moineau, 1999).

En vista de los sistemas de regulación actuales para microorganismos de grado alimentario, es poco probable que las cepas modificadas genéticamente puedan ser utilizadas para aplicaciones industriales (Moineau, 1999).

III.5.7. 4. Cepas insensibles a fagos: cepas salvajes

Es posible encontrar cepas que resisten los ataques continuos por parte de una gran variedad de fagos, y mantienen esta resistencia por largos períodos, aún bajo las condiciones más adversas. Sin duda, la estabilidad de la fagorresistencia en el tiempo estará condicionada por los tipos de fagos a los cuales deberá enfrentarse, y por las condiciones ambientales presentes en cada planta en particular. Sin embargo, la estabilidad también está ligada a la elevada eficacia de los mecanismos de defensa innatos presentes en la propia cepa.

Un ambiente de continua presión fágica puede derivar en una selección natural de cepas resistentes a fagos (Klaenhammer, 1984). Así, los sucesivos repiques

realizados a partir de un cultivo mixto constituido originalmente por una mezcla de cepas sensibles a fagos y cepas fagorresistentes, conducirán irremediablemente al aumento gradual de la población bacteriana fagorresistente.

Por todo lo expuesto, el aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes se ha convertido en la alternativa más sencilla y "natural" para la obtención de cepas con fagorresistencia mejorada, la cual puede ser aplicada en la actualidad sin restricciones de ningún tipo. Esta estrategia adquiere aún mayor relevancia en el caso de cultivos probióticos fago-sensibles. El reemplazo de las cepas probióticas no siempre es tarea sencilla. La nueva cepa que sustituya al cultivo original debe poseer, además de una fagorresistencia mejorada, propiedades tecnológicas y probióticas comparables a la cepa original, condiciones que pueden fácilmente satisfacer los mutantes espontáneos fagorresistentes.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo de tesis son:

Objetivo general

◆ Desarrollar conocimientos científicos sobre fagos argentinos de *Lactobacillus delbrueckii*, así como estrategias que permitan disminuir los problemas derivados de sus infecciones sobre los starters en la industria láctea fermentativa local.

Objetivos particulares

◆ Aislar nuevos fagos autóctonos de *Lactobacillus delbrueckii* y caracterizarlos, desde un punto de vista morfológico y molecular.

◆ Obtener mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de cepas sensibles.

◆ Identificar los mecanismos de fagorresistencia existentes en los mutantes y verificar su estabilidad.

◆ Estudiar, a nivel tecnológico, el potencial de las variantes fagorresistentes como fermentos a escala industrial.

◆ Caracterizar las cepas de *Lb. delbrueckii* sensibles a fagos, así como sus mutantes fagorresistentes, según criterios biológicos y probióticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Cepas bacterianas y bacteriofagos

Las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* utilizadas en este trabajo fueron aisladas en el INLAIN entre 1997 y 2000, a partir de fermentos comerciales utilizados en la elaboración de leches fermentadas que presentaron retrasos en la acidificación. Estas cepas se identificaron como *Lb. delbrueckii* Ab₁, *Lb. delbrueckii* lb₃ y *Lb. delbrueckii* YSD V. Las cepas fueron desarrolladas en caldo MRS, e incubadas durante 16-18 h (over-night) a 42°C.

Se utilizaron tres fagos líticos, autóctonos, aislados en el INLAIN a partir de las muestras de leches fermentadas mencionadas anteriormente. Los fagos se identificaron como YAB, lb₃ y BYM, y son líticos de *Lb. delbrueckii* Ab₁, *Lb. delbrueckii* lb₃ y *Lb. delbrueckii* YSD V, respectivamente.

Para realizar el ensayo del efecto inhibitorio de sobrenadantes de cepas de *Lb. delbrueckii* sobre microorganismos patógenos (Secciones IV.7.4 y IV.7.5), se emplearon cepas pertenecientes a la colección del INLAIN: *Salmonella* sp. OMS-Ca, *Staphylococcus aureus* 76, *Escherichia coli* V517 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. Las tres primeras se cultivaron en caldo TS (Anexo), mientras que *L. monocytogenes* se cultivó en caldo BHI (Anexo). Todas las cepas se incubaron over-night (16-18 h) a 37°C en forma aeróbica.

Para el estudio de inhibición de la adhesión e invasión de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis por sobrenadantes de cultivos de *Lb. delbrueckii* a células Caco-2/TC-7 (Sección IV.7.7), se utilizó una cepa aislada en el Hospital de Pediatría Prof. Juan P. Garrahan (Buenos Aires, Argentina). Esta cepa fue desarrollada en caldo nutritivo (Anexo), e incubada durante 16-18 h a 37°C en aerobiosis.

I.1. Conservación de las cepas

Las cepas bacterianas fueron conservadas por congelamiento a -20°C y -80°C, en diferentes medios. Las cepas de *Lb. delbrueckii* fueron congeladas en leche descremada reconstituida estéril al 10% (p/v) (LDR) (Anexo) o caldo MRS (Anexo)

adicionado al 15% (v/v) de glicerol. Por otro lado, se utilizó caldo TS para *Salmonella* sp. OMS-Ca, *Staphylococcus aureus* 76 y *E. coli* V517, caldo BHI para *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 y caldo nutritivo para *S. enterica* serovar Enteritidis, siempre adicionados de 15% (v/v) de glicerol.

Las cepas fueron desarrolladas durante 16-18 h (over-night) en LDR o caldo MRS a 42°C (*Lb. delbrueckii*), o a 37°C en caldo TS (*Salmonella* sp. OMS-Ca, *Staphylococcus aureus* 76, *E. coli* V517), caldo BHI (*Listeria monocytogenes* ATCC 15313) o caldo nutritivo (*S. enterica* serovar Enteritidis) y luego inoculadas al 10% en el medio crioprotector, congelando alícuotas de 1 ml.

Para su reactivación, las cepas conservadas por congelamiento fueron inoculadas al 2% en el medio de cultivo líquido correspondiente, e incubadas a la temperatura óptima de desarrollo durante 16-18 h.

1.2. Conservación de los fagos

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

1.3. Propagación de los fagos

Los fagos empleados fueron propagados sobre sus correspondientes cepas sensibles, usando caldo MRS-Ca (Anexo).

Un cultivo en caldo MRS obtenido por incubación durante 16-18 h de la cepa sensible fue inoculado (3%) en caldo MRS-Ca, y se le adicionó el fago a diferentes dosis infectivas (m.o.i., multiplicity of infection = concentración de partículas virales/ concentración de células bacterianas), variables entre 10^{-2} y 10^{-3} aproximadamente. Asimismo, se inoculó un tubo sólo con la cepa (control), para observar el normal

crecimiento de la misma. Los tubos fueron agitados suavemente en forma periódica y examinados durante la incubación a 42°C (aproximadamente 5 h). Se eligió el m.o.i. para el cual la lisis se manifestó en forma completa y más tardíamente, lo que aseguró una máxima propagación de las partículas fágicas. El lisado resultante fue prefiltrado (prefiltro Millipore) y luego filtrado (membranas estériles Millipore, diámetro de poro 0,45 µm), a fin de eliminar los restos celulares. Estas suspensiones de fagos se almacenaron a 4°C, -20°C y -80°C (como fue detallado anteriormente), y se utilizaron como stock en todas las experiencias.

I.4. Titulación de los fagos

La concentración de partículas fágicas (título) presentes en los lisados obtenidos durante las propagaciones, así como en todas las experiencias donde se cuantifiquen las mismas, se determinó por la técnica de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991), modificada de la siguiente forma: en cajas de Petri estériles divididas en cuartos, se repartió en cada sector 2,5 ml de agar MRS-Ca-glicina (Anexo) y se dejó solidificar. Por otro lado, se prepararon diluciones decimales de las suspensiones fágicas a testear, en caldo MRS. Se colocaron 100 µl de dichas diluciones en tubos de hemólisis, adicionados de CaCl₂ (10 mM), 1 ml de MRS soft-agar (Anexo) y 100 µl de un cultivo de la cepa sensible en fase exponencial de desarrollo.

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

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

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

Donde f_d = factor de dilución.

I.5. Caracterización de los fagos

I.5.1. Microscopía electrónica

Las micrografías de los fagos autóctonos se realizaron en la Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias (INTA- Castelar). Para obtener las micrografías se partió de suspensiones fágicas que fueron concentradas por centrifugación y posteriormente sometidas a tinción con acetato de uranilo (UA, 2% p/v, pH 4,5) o ácido fosfotúngstico (PTA, 2% p/v) (Bolondi y col., 1995).

I.5.2. Caracterización molecular

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

I.5.2.1. Extracción de ADN fágico

Se inocularon 50 ml de caldo MRS adicionado de CaCl_2 (10 mM) con la cepa sensible (2%), y con el fago, a una dosis infectiva adecuada para que la lisis total se produjera aproximadamente a las 4-6 h de incubación a 42°C. Cuando se observó la lisis completa del cultivo, se centrifugó a 10000 x *g* durante 10 min. Se recogió el sobrenadante y se le añadieron 10 ml de PEG-NaCl (20% PEG 6000; 2,5 M NaCl), y se precipitó a 4°C durante toda la noche. Luego se centrifugó a 10000 x *g* durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y se dio un pulso en la centrífuga para que no queden restos del medio. El pellet se resuspendió en 0,4 ml de tampón SM (Anexo) adicionado de RNAsa (40 µg/ml). Se incubó a 37°C durante 30 min. Se añadieron 80 µl de la mezcla de lisis (Anexo). Se incubó a 65°C durante 30 min. Se añadieron 100 µl de acetato de potasio (8 M), incubándose sumergido en hielo durante 15 min. Se centrifugó a 13200 x *g* durante 15 min a 4°C. Se adicionó un volumen igual de isopropanol, dejando reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Se centrifugó nuevamente durante 5 min, desechándose el sobrenadante. Se resuspendió en 630 µl

de buffer TE (Anexo). Una vez resuspendido, se agregaron 70 µl de acetato de sodio (3 M) y 700 µl de isopropanol, dejando en reposo a temperatura ambiente durante 5 min. Esta operación (desde el agregado de buffer TE), se repitió una vez más. Luego se recuperó el ADN por centrifugación (10 min, 13000 x *g*), y se lavó con 1 ml de etanol absoluto (3 veces) y 1 ml de etanol 70% durante 1 min. Se resuspendió el ADN fágico en buffer TE, y se conservó a -20°C.

I.5.2. 2. Perfiles de restricción

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

I.5.2. 3. Sitios de empaquetamiento (*cos*-, *pac*- sites)

Una alícuota de ADN fágico purificado se sometió a ligación (1 h, 16°C), utilizando el kit Ready-to-go T4 DNA Ligasa (Amersham Pharmacia, England), luego se inactivó la ligasa durante 15 min a 65°C. El ADN así tratado se denominó *ADN ligado*. Una porción de ADN fágico ligado y otra de ADN fágico sin ligar fueron sometidas a digestiones con endonucleasas de restricción (*Hind*III y *Bgl*II), de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. Luego de las digestiones, los fragmentos de restricción fueron sometidos a tratamiento térmico (70°C durante 10 min). La mezcla de fragmentos fue separada mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8% p/v).

II. Aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de cepas sensibles a fagos

Con el objetivo de aislar mutantes espontáneos resistentes a fagos a partir de cepas fago-sensibles, se utilizaron los sistemas compuestos por *Lb. delbrueckii* Ab₁ y su

fago lítico YAB, *Lb. delbrueckii* Ib₃ y el fago lítico Ib₃, y *Lb. delbrueckii* YSD V y su fago lítico BYM.

II.1. Metodologías utilizadas en el aislamiento de los mutantes fagorresistentes

Se utilizaron dos metodologías:

- ◆ Medio agarizado
- ◆ Cultivos secundarios

II.1.1. Medio agarizado

Se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Reinheimer y col. (1995) modificada y adaptada a los sistemas en estudio. Un cultivo de la cepa sensible en caldo MRS se desarrolló hasta una DO₅₆₀ de 0,55-0,60, y 10 ml de este cultivo fue infectado con el fago específico a diferentes m.o.i. (1, 10⁻¹ y 10⁻²); se mezcló con 3 ml de MRS soft-agar y distribuyó en cajas de Petri conteniendo agar MRS-Ca-glicina. Durante las primeras 24 h de incubación, los fagos atacaron aquellos clones sensibles a ellos produciendo su lisis, lo que se tradujo en ausencia de desarrollo visible en el medio agarizado. Aquellas placas de Petri en las cuales no se observó la lisis total de los cultivos (en 24 h), fueron descartadas. Mientras tanto, los clones fagorresistentes comenzaron a multiplicarse, y se observaron las colonias en la superficie del medio agarizado. Dichas colonias, formadas por las células que resistieron (presuntivamente) el ataque de los fagos, se detectaron luego de 48 h de incubación en microaerofilia a 42°C, y fueron consideradas como probables variantes fagorresistentes.

II.1.2. Cultivos secundarios

Se utilizó la técnica previamente descrita por varios autores (Callegari, 1992; Carminati y col., 1993), introduciendo algunas modificaciones. Un cultivo de la cepa sensible (DO₅₆₀ = 0,55-0,60), fue inoculado al 1% en caldo MRS-Ca, e infectado con una suspensión fágica a diversas diluciones (m.o.i.= 1, 10⁻¹ y 10⁻²). Durante el curso de la

incubación a 42°C, se controló periódicamente el crecimiento de los cultivos infectados, y fue comparado con un control de la cepa sin infectar. Se seleccionaron aquellos tubos en los que se observó la lisis más tardía y completa del cultivo y un posterior desarrollo (desarrollo secundario de clones fagorresistentes presuntivos), luego de 24-48 h adicionales a 42°C. A partir de estos tubos, se realizaron siembras en forma de estrías en cajas de Petri conteniendo agar MRS. Luego de la incubación (48 h, 42°C), se aislaron las colonias obtenidas.

Los clones presuntivamente fagorresistentes aislados por ambas metodologías fueron purificados y separados de las partículas fágicas mediante tres estríados sucesivos en agar MRS.

III. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO FAGORRESISTENCIA

III.1. Confirmación de la fagorresistencia

Se aplicó el Test de Turbidez (Svensson y Christiansson, 1991) con el objetivo de confirmar el fenotipo fagorresistencia de los clones aislados. Para ello, cada mutante presuntivo fue inoculado en un tubo conteniendo 5 ml de caldo MRS-Ca y una dosis de fago (m.o.i = 1, aproximadamente). El fago utilizado en cada caso fue aquel capaz de infectar a la cepa sensible de la cual se obtuvieron los mutantes correspondientes. Así, para las variantes fagorresistentes presuntivas aisladas a partir de *Lb. delbrueckii* Ab₁, se utilizó el fago lítico YAB, para aquellas aisladas de *Lb. delbrueckii* Ib₃, se usó el fago Ib₃, y para las aisladas a partir de *Lb. delbrueckii* YSD V, se utilizó el fago BYM. Los mutantes inoculados en caldo MRS-Ca fueron incubados a 42°C, controlando el aumento de la turbidez (por desarrollo del cultivo). Estos cultivos fueron comparados con tubos control, los cuales se inocularon sólo con el mutante (sin agregado de fago). Aquellos tubos que no presentaron lisis (disminución de turbidez) luego de la incubación, fueron repicados nuevamente en tubos conteniendo 5 ml de caldo MRS-Ca. En total, se realizaron tres repiques sucesivos (en caldo MRS-Ca) de cada uno de los mutantes fagorresistentes presuntivos aislados. Aquellos capaces de resistir los tres repiques, fueron retenidos como verdaderos mutantes resistentes a fagos (Reinheimer y col., 1993).

Los mutantes fagorresistentes confirmados fueron desarrollados en caldo MRS o LDR enriquecida con hidrolizado de caseína (0,25% p/v), de manera de asegurar un desarrollo adecuado. Asimismo, estos mutantes fueron congelados en caldo MRS adicionado de glicerina (15% v/v), o LDR adicionado de hidrolizado de caseína (0,25% p/v) a -20°C y -80°C. El agregado del hidrolizado de caseína aseguró que las cepas tuvieran una fuente nitrogenada disponible para utilizar.

III.2. Eficiencia de recuperación de mutantes fagorresistentes

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

Eficiencia = (Nº de mutantes fagorresistentes confirmados / Nº de mutantes fagorresistentes presuntivos) x 100

III.3. Espectro de hospedadores de los mutantes fagorresistentes

En este caso, el Test de Turbidez se efectuó para comprobar la resistencia de los mutantes respecto al resto de los fagos líticos. Con esa finalidad, cultivos en caldo MRS-Ca de los mutantes de *Lb. delbrueckii* Ab₁ se pusieron en contacto con dosis de los fagos Ib₃ y BYM (líticos de *Lb. delbrueckii* Ib₃ y de *Lb. delbrueckii* YSD V, respectivamente), cultivos de los mutantes de *Lb. delbrueckii* Ib₃ con dosis de los fagos BYM y YAB (lítico de *Lb. delbrueckii* Ab₁), y los mutantes de *Lb. delbrueckii* YSD V con dosis de los fagos Ib₃ y YAB. En todos los casos, se utilizaron como control tubos conteniendo cultivos de los mutantes sin agregado de fago. Se realizaron tres repiques sucesivos (en caldo MRS-Ca) de cada mutante fagorresistente con los fagos testeados.

III.4. 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 42°C. Se registró el número del repique en el cual el mutante resultó lisado por el fago.

III.5. Nivel de fagoresistencia (EOP, efficiency of plaquing)

Una suspensión del fago (10^8 UFP/ml, aproximadamente) en caldo MRS, fue titulada (técnica de la doble capa agarizada, Sección I.4) en paralelo sobre un cultivo de la cepa sensible respectiva y sobre un cultivo del mutante fagoresistente estudiado, utilizando agar MRS-Ca-glicina 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).

III.6. Lisogenia

Para investigar la posibilidad de resistencia debida a lisogenia en las variantes fagoresistentes aisladas, se desarrolló un cultivo de los mismos en caldo MRS durante 16-18 h (42°C), se sometió a centrifugación (5 min, 10000 x *g*) y se tituló el sobrenadante sobre la cepa sensible correspondiente en agar MRS-Ca-glicina, mediante la técnica de la doble capa agarizada anteriormente descrita. La eventual liberación espontánea de partículas fágicas produce placas de lisis visibles (Cluzel y col., 1987).

III.7. Tasas de adsorción

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

Las cepas bacterianas en estudio fueron desarrolladas en caldo MRS a 42°C hasta alcanzar la fase exponencial temprana ($DO_{560} = 0,4 - 0,5$), cosechándose luego las células por centrifugación (10 min, 4500 x *g*). Se separó el sobrenadante, y el pellet

se resuspendió en caldo MRS-Ca fresco en la mitad del volumen original. Cada cultivo se infectó con su fago específico (m.o.i. = 0,02) en tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad. Se realizó una incubación a 42°C durante 30 min en baño de agua termostatzado. Transcurrido este tiempo se retiraron los tubos, y se los colocó en baño de hielo (para frenar la adsorción) y se centrifugaron (5 min, 12000 x *g*), con el objetivo de separar las células que poseen fagos adsorbidos, de los fagos libres. Se extrajeron alícuotas (100 µl) de los sobrenadantes y se titularon sobre la cepa sensible (método de la doble capa agarizada) para conocer la concentración de fagos libres.

Los porcentajes de adsorción (sobre la cepa sensible y mutantes resistentes) se calcularon considerando la concentración de fagos al tiempo cero, y la remanente luego de la incubación (Carminati y col., 1993), de la siguiente forma:

$$\%Ads = [(Ti - Tf) / Ti] \times 100$$

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

IV. CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES FAGORRESISTENTES

IV.1. Morfología

Se observó la morfología de las colonias de los mutantes espontáneos fagorresistentes desarrolladas por estriados en agar MRS (42°C, 48 h), comparándolas con la morfología de las cepas sensibles.

La morfología celular fue determinada a través de observación directa al microscopio óptico a partir de preparados en gota fresca, con inmersión, contraste de fases y aumento de 1000x.

IV.2. Perfil fermentativo de azúcares

Se utilizó el sistema comercial de identificación API CH (galerías API CH, medio de cultivo API CHL) (Bio Merieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Cultivos de 16-18 h (42°C) de las cepas y sus mutantes fagorresistentes en caldo MRS fueron centrifugados a 6000 x *g* durante 15 min. El sedimento se resuspendió en 4 ml de agua estéril y nuevamente se centrifugó a 6000 x *g* (15 min). Luego de un segundo lavado con agua estéril para eliminar los restos de medio de cultivo, las células fueron resuspendidas en 2 ml de agua estéril, obteniendo una suspensión densa (S). A continuación, se realizó una suspensión de turbidez igual al patrón 2 de la escala McFarland en otro tubo conteniendo 2 ml de agua destilada estéril. Esta suspensión se realizó transfiriendo un cierto número de gotas de la suspensión S previamente preparada, y anotando el número de gotas de S necesarios para llegar a la turbidez deseada. Las suspensiones así obtenidas, se inocularon en el medio de cultivo API CHL, y posteriormente se sembraron en las galerías API CH. Finalmente, se adicionó vaselina estéril para lograr la anaerobiosis. Las galerías fueron incubadas a 42°C, realizando la lectura a las 24 y 48 h.

IV.3. Estudios genéticos

Los estudios genéticos se realizaron en el Istituto Sperimentale Lattiero Caseario (ILC, Lodi, Italia), en el marco de una pasantía de especialización, bajo la dirección de los Doctores Giorgio Giraffa y Domenico Carminati. Tuvieron como objetivos: a) confirmar la identificación (a nivel de subespecie) de las cepas sensibles y las variantes fagorresistentes aisladas a partir de las mismas, y b) comparar la homología genética entre las cepas madres, sensibles a fagos, respecto a los mutantes fagorresistentes, de manera de asegurar que los mutantes aislados no fueran el producto de contaminaciones involuntarias.

IV.3.1. Extracción del ADN total bacteriano

El protocolo utilizado (descrito por MicroSeq™) se basa en una extracción rápida (comparada con la extracción tradicional del ADN total bacteriano), en la cual se utilizan resinas quelantes de acuerdo al método descrito para bacterias Gram positivas (y acidificantes), y usando los reactivos incluidos en el kit (Giraffa y col., 2000).

Alícuotas de 200 µl de cultivos over-night (16-18 h, 42°C) de las cepas sensibles y sus mutantes fagorresistentes fueron centrifugadas (5 min, 7500 x *g*, 4°C) en tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad. Los pellets obtenidos se lavaron con 500 µl de buffer TE_{0,1} (Anexo) y se centrifugaron nuevamente (5 min, 7500 x *g*, 4°C). El sobrenadante fue descartado, y los pellets se resuspendieron en 245 µl de buffer TE_{0,1}, adicionándose 5 µl de lisozima (50 mg/ml). Esta mezcla fue incubada durante 45 min a 56°C en baño termostatzado. Luego de la incubación, se adicionó 250 µl de “mezcla de lisis” (buffer TE_{0,1}, DTT 1 M, EDTA 0,25 M, SDS 10% p/v y proteinasa K 20 mg/ml) (Anexo) a cada tubo, incubándose durante 1 h a 37°C en baño termostatzado. Posteriormente, se adicionaron 500 µl de solución de Chelex (5% p/v) (Anexo) a cada muestra, y se incubó durante 15-30 min a 56°C en baño termostatzado. La solución de Chelex actúa reteniendo las impurezas del ADN extraído. Los tubos se agitaron en vortex durante 10 seg, y luego se incubaron 8 min a 100°C. Luego, los tubos fueron centrifugados (2 min, 10000 x *g*), y los sobrenadantes se transfirieron cuidadosamente a tubos Eppendorf limpios. Se realizaron diluciones 1:10 de los sobrenadantes en agua estéril, las cuales se congelaron (tanto las muestras diluídas y no diluídas) a -20°C hasta el momento de su uso.

IV.3.2. Análisis de amplificación y restricción del ADN ribosomal (PCR- ARDRA)

El análisis de PCR-ARDRA fue aplicado a las cepas sensibles y a sus respectivos mutantes fagorresistentes, con el objetivo de confirmar la identificación de especie/subespecie. Se incluyeron, además, dos cepas “type” como controles positivos: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 12315^T y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842^T.

La amplificación de los genes de la región 16S del ADNr, se realizó en un volumen total de 25 µl, conteniendo 2,5 µl de buffer de PCR 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de los oligonucleótidos iniciadores, 1 µl de ADN genómico y 2,5 U/100 µl de DNA *Taq* polimerasa (Anexo), utilizando un termociclador. La desnaturalización inicial (94°C, 2 min) fue seguida por 30 ciclos de 94°C durante 30 seg (desnaturalización), 60°C durante 30 seg (hibridación), y 72°C durante 30 seg (extensión), y una elongación final a 72°C durante 10 min. Se obtuvieron fragmentos de ADN de aproximadamente 1,5 kb, correspondientes a los genes de la región 16S del ADNr, usando los oligonucleótidos iniciadores descritos por Rodtong y Tannock (1993): 5'-CCGAGCTCAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 5'-GGTCGACCGTTAATACGACTC ACTATAGGGATACCTTGTTACGACTT-3'. Luego de esto, se procedió a cortar el ADN amplificado, utilizando la enzima de restricción *EcoRI*. Con este fin, se pusieron en contacto 10 µl del ADN amplificado con *EcoRI* y el buffer correspondiente, siendo el volumen total de 15 µl. Esta mezcla fue incubada durante 1 h a 37°C en baño termostático. Los perfiles de restricción se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1,5% p/v) (Anexo). Así, una vez finalizada la incubación, se sembraron los 15 µl del producto de la digestión enzimática en geles de agarosa, adicionado de buffer de carga (loading buffer) (Anexo). Los pocillos de los extremos del gel se sembraron con 15 µl de marcador de peso molecular 1 kbp Plus DNA Ladder. Posteriormente, se realizó la corrida electroforética a 26 V durante toda la noche. Las bandas obtenidas fueron visualizadas mediante tinción con bromuro de etidio y luz UV. Las imágenes de los perfiles de restricción fueron capturadas mediante un sistema digital (EDAS 290: Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 290) provisto de un gabinete de captura de imágenes EDAS 290, y guardadas como archivos de imágenes JPEG.

IV.3.3. RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction)

El grado de similitud (homología genética) entre las cepas madres, sensibles a fagos, y los derivados fagoresistentes, se determinó mediante el análisis de los perfiles RAPD.

Para ello, se partió de ADN total bacteriano extraído previamente a partir de las cepas sensibles y de sus mutantes fagorresistentes (como se detalló en la Sección IV.3.1). Para este estudio, se utilizaron dos oligonucleótidos iniciadores (primers) en ensayos independientes. Los primers utilizados fueron M13 (Huey y Hall, 1989; Stendid y col., 1994) y 1254 (Akopyanz y col., 1992), cuyas secuencias son 5'-GAGGGTGGCGGTCT-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 DNA *Taq* polimerasa, 3,0 mM de $MgCl_2$, 2,0 μ M de primer M13 ó 0,8 μ M de primer 1254, y 1,5 μ l de ADN bacteriano. El programa de amplificación para el primer M13 se llevó a cabo de acuerdo a Giraffa y col. (2000). La etapa inicial de desnaturalización (94°C, 2 min) fue seguida por 40 ciclos de 94°C durante 1 min (desnaturalización), 45 °C durante 20 seg (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 necesitaron cuatro ciclos iniciales de 94°C durante 5 min, 36°C durante 5 min y 72°C durante 5 min, seguidos por 30 ciclos de 94°C durante 1 min (desnaturalización), 36°C durante 1 min (hibridación) y 72°C durante 2 min (extensión), y una elongación final a 72°C durante 10 min. Luego de la amplificación, se realizaron electroforesis en geles de agarosa (1,5% p/v). Las bandas obtenidas fueron visualizadas mediante tinción con bromuro de etidio y aplicación de luz UV. Se utilizó 1kbp Plus DNA Ladder como marcador de peso molecular de ADN. Las imágenes de los perfiles de amplificación fueron capturadas mediante un sistema digital provisto con el gabinete de captura de imágenes, y guardadas como archivos TIFF. Posteriormente fueron analizadas utilizando el software para análisis de perfiles de BioNumerics™ (Versión 3,0; Applied Maths BVBA, Saint-Martens-Latem, Bélgica). El cálculo de similitudes de los perfiles estuvo basado en el coeficiente *r* de Pearson, y las cepas fueron agrupadas usando UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Averages) (Vauterin y Vauterin, 1992).

IV.4. Análisis de proteínas de pared mediante SDS-PAGE

Este ensayo se realizó en colaboración con la Dra. M. E. Fornasari, en el Istituto Sperimentale Lattiero Caseario (ILC, Lodi, Italia).

El análisis de las proteínas superficiales de la pared bacteriana por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio) fue diseñado para la identificación de distintas especies de lactobacilos termófilos (Gatti y col., 1997). Mediante esta metodología es posible lograr la diferenciación de dos subespecies muy relacionadas, como son *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Gatti y col., 2001).

IV.4.1. Extracción de proteínas de la pared bacteriana

Cultivos over-night (16-18 h, 42°C) de *Lb. delbrueckii* YSD V, Ib₃ y Ab₁ fueron inoculados (1%) en 10 ml de MRS, e incubados hasta fase exponencial de crecimiento (3-8 h, 42°C). Los cultivos así desarrollados, fueron centrifugados (7000 x *g*, 10 min, 4°C), descartando los sobrenadantes. Los pellets se lavaron dos veces con agua destilada estéril, y se resuspendieron en 0,5 ml de agua destilada estéril. Los pellets resuspendidos fueron inoculados en tubos conteniendo 5 ml de agua destilada estéril, hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 2,0 ± 0,5. A partir de los tubos inoculados, se tomaron 3 ml y se centrifugaron (6000 x *g*, 15 min, 4°C), descartando el sobrenadante. Los pellets fueron adicionados de 0,5 ml de buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 10 mM, pH 8) y 0,5 ml de SDS 2% (p/v) (agente de extracción). Esta mezcla se incubó durante 5 min a 100°C, y se centrifugó (8000 x *g*, 10 min, 4°C). Se tomaron 0,5 ml del sobrenadante y se llevó a sequedad utilizando un equipo SpeedVac SV100. La misma metodología se aplicó a las cepas control *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ILC 232 y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ILC 333, pertenecientes a la colección del Istituto Sperimentale Lattiero Caseario.

IV.4.2. Separación de las proteínas de pared por SDS-PAGE

Las muestras secas fueron adicionadas de 50 µl de buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 10 mM, pH 8) y 3 µl de azul de Bromofenol, y se sembraron en el gel (Phast gel de gradiente 10-15), colocando en ambos extremos el marcador de peso molecular (Anexo). Se realizó la corrida electroforética según las condiciones

apropiadas para el gel de gradiente 10-15 (Phast System). El gel fue coloreado con azul de Coomasie.

IV.5. Caracterización tecnológica

IV.5.1. Actividad acidificante

La acidez desarrollada por los mutantes espontáneos fagorresistentes, se cuantificó a partir de cultivos activos en LDR incubados a 42°C durante 24 h. Estos cultivos fueron obtenidos a partir de stocks (4°C) de los mutantes en LDR adicionado de hidrolizado de caseína (0,25% p/v) (LDR-HC). A partir de estos stocks, se realizaron tres repiques sucesivos en 10 ml de LDR-HC, inoculándolos al 2% e incubando a 42°C (16-18 h). El cuarto repique se realizó en LDR (2%) e incubando a 42°C durante 24 h. El quinto y último repique también se realizó en LDR (2%), y se incubó a 42°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se determinó la acidez desarrollada por titulación con una solución de NaOH 0,1 N hasta alcanzar pH 8,4. El mismo procedimiento se realizó para cultivos de las cepas sensibles a fagos, las cuales se utilizaron como parámetro de comparación. Los resultados se expresaron como porcentaje de ácido láctico producido (% de ácido láctico), calculados de la siguiente manera:

$$\% \text{ de ácido láctico} = [V_{\text{NaOH}} \times V_{\text{muestra}} \times f_{\text{NaOH}}] / 100$$

Donde V_{NaOH} = volumen (en ml) de NaOH 0,1 N consumido en la titulación; V_{muestra} = volumen (en ml) de muestra titulada (cultivo en LDR); f_{NaOH} = factor de normalización del NaOH.

IV.5.2. Actividad proteolítica

Se empleó el método de OPA (Church y col., 1983), utilizando *o*-ftaldehído como reactivo que, en presencia de β -mercaptoetanol, tiene la capacidad de unirse a los grupos α -amino liberados por acción del sistema proteolítico bacteriano, generando un producto que absorbe fuertemente a $\lambda = 340 \text{ nm}$.

Se tomaron 5 ml de un cultivo (24 h, 42°C) en LDR de cada cepa sensible y sus mutantes fagorresistentes (provenientes de tres repiques sucesivos en LDR), a los cuales se les adicionó 1 ml de agua bidestilada y 10 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,75 N (Anexo). Las mezclas se agitaron vigorosamente con vortex y se dejaron en reposo durante 10 min, de manera de favorecer la precipitación de proteínas y péptidos de mayor tamaño. Luego se centrifugaron (10000 x *g*, 5 min), recuperando los sobrenadantes (donde se localizan los péptidos cortos y aminoácidos liberados). A una alícuota (50 µl) de estos sobrenadantes se les adicionó 1 ml de reactivo de OPA preparado en el momento (Anexo), y se dejaron reaccionar durante 2 min. Al cabo de este tiempo, se determinó la absorbancia (A_{340}) para cada muestra. También se procesó un control de LDR sin inocular (testigo) de la misma forma que los cultivos bacterianos. Los resultados se expresaron como sigue:

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

IV.5.3. Cinéticas de acidificación en leche

A partir de stocks refrigerados (4°C) de los cultivos de las cepas madres y sus mutantes espontáneos fagorresistentes, se realizaron tres repiques sucesivos (2%) en 10 ml de LDR-HC. El cuarto repique de los cultivos fue inoculado (2%) en LDR (sin HC). Estos repiques sucesivos fueron incubados 24 h a 42°C. A partir del cuarto repique (en LDR) de los cultivos, se realizó un inóculo (2%) en 100 ml de LDR estéril, repartiendo alícuotas de 10 ml en tubos de ensayo. Los tubos así repartidos fueron incubados a 42°C en baño termostático. A intervalos de tiempo preestablecidos (entre 0 y 24 h), se retiraron tubos inoculados y se determinaron los valores de pH, graficando su evolución en función del tiempo.

IV.5.4. Caracterización de las variantes "lentas" aisladas de *Lb. delbrueckii* Ab₁

Esta prueba se realizó con el objetivo de determinar la capacidad de los mutantes espontáneos fagorresistentes para utilizar la lactosa (fuente de carbono) y la caseína (fuente de nitrógeno) presentes en la leche (McKay y Baldwin, 1974; Efstathiou

y McKay, 1976). El carácter de cada mutante fue determinado luego de tres repiques (2%) sucesivos en LDR-HC (24 h, 42°C). El cuarto repique se inoculó (2%) sólo en LDR, y se incubó (24 h, 42°C). El quinto y último repique se inoculó (2%) en cuatro condiciones distintas: LDR, LDR + hidrolizado de caseína (HC) (0,25% p/v), LDR + glucosa (Glu) (1% p/v), y LDR + HC (0,25% p/v) + Glu (1% p/v). La incubación se realizó durante 24 h a 42°C. A partir de la medición del pH resultante del desarrollo y acidificación en las diversas condiciones, se definió el carácter "fast" o "slow" de las variantes espontáneas fagorresistentes, es decir su aptitud para desarrollar en leche.

IV.6. Caracterización biológica *in vitro*

El objetivo de esta etapa del estudio fue evaluar la resistencia a barreras biológicas *in vitro*, y el potencial probiótico de las cepas de *Lb. delbrueckii*, y de sus mutantes fagorresistentes, los cuales podrían convertirse en cultivos alternativos para la elaboración de productos lácteos funcionales.

Para realizar las pruebas biológicas y probióticas, se eligió una temperatura de incubación de 37°C, por ser la temperatura fisiológica del cuerpo humano. El objetivo de estas condiciones de incubación fue reproducir las condiciones observadas *in vivo*.

Los ensayos biológicos y probióticos se realizaron sobre las tres cepas fago sensibles, *Lb. delbrueckii* YSD V, *Lb. delbrueckii* Ab₁ y *Lb. delbrueckii* Ib₃, y sobre algunos de sus mutantes fagorresistentes, seleccionados de acuerdo a la caracterización tecnológica previa.

Según ciertos criterios, para que un microorganismo probiótico pueda ejercer sus efectos benéficos sobre la salud del consumidor debe llegar viable al intestino. Esto implica la capacidad de sobrevivir al pasaje por el tracto gastrointestinal, resistiendo el contacto con la acidez estomacal, bilis y enzimas. Así, estudiando la tolerancia a barreras biológicas *in vitro* de las cepas, puede conocerse su capacidad de resistir el pasaje por el tracto gastrointestinal para llegar viables al intestino.

IV.6.1. Tolerancia a jugo gástrico simulado

Para estudiar el efecto de la acidez estomacal sobre las cepas sensibles de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes espontáneos, se empleó el método desarrollado por Charteris y col. (1998) modificado de la siguiente manera: se cosecharon (12000 x *g*, 5 min, 5°C) células a partir de 1 ml de cultivos over-night (16-18 h, 42°C) de cada cepa, lavando los pellets dos veces con buffer fosfato (0,1 M, pH 6,5) (Anexo). Luego se ajustó la DO₅₆₀ a 0,8 en buffer fosfato (control) y en solución gástrica simulada (pH 2) (Anexo). Las soluciones celulares acidificadas y control se incubaron durante 90 min a 37°C en un baño termostatzado. Se realizaron recuentos de células viables en agar MRS antes (t = 0) y luego del tratamiento (t = 90 min) en la solución gástrica simulada, incubando las placas a 42°C durante 48 h.

Paralelamente, se estudió el efecto del agregado de leche sobre la viabilidad celular. Para tal fin, 1 ml de cultivos over-night de las cepas (en caldo MRS) y sus mutantes fagorresistentes, fueron centrifugados (12000 x *g*, 5 min, 5°C), y las células preparadas de manera similar que en el caso anterior. Luego de ajustar la DO₅₆₀, las células fueron incubadas (37°C, 90 min) en buffer fosfato (control), y en solución gástrica simulada (pH 2) adicionada de 20% (v/v) de LDR estéril (Schillinger y col., 2005). Se realizaron recuentos de células viables (agar MRS) antes de la incubación y luego de la misma, incubando las placas a 42°C durante 48 h.

Por último, se estudió la viabilidad de los cultivos en jugo gástrico simulado, pero desarrollándolos previamente en LDR, para simular la acidificación que producen durante la elaboración de leches fermentadas (ej. yogur). Con este objetivo, cultivos over-night (16-18 h, 42°C) de las cepas madres de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes fueron inoculados (2%) en LDR, y se incubaron a 42°C hasta que alcanzaron un pH aproximado de 4,3 (simulando las características de un yogur). Estos cultivos en LDR (pH aproximado de 4,3) se inocularon en buffer fosfato y jugo gástrico simulado, en una concentración tal que permitió alcanzar las UFC/ml iniciales de los dos ensayos anteriores. Luego de 90 min a 37°C, se realizaron recuentos de células viables en agar MRS, incubando las placas a 42°C durante 48 h.

IV.6.2. Resistencia a la bilis

La capacidad de permanecer viables en presencia de bilis es otra propiedad deseada en los microorganismos probióticos seleccionados, ya que al igual que la resistencia a la acidez estomacal, aumenta las probabilidades de que la bacteria llegue intacta al intestino (Tuomola y col., 2001; Ouwehand y col., 2002).

Se determinó la capacidad de las cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes espontáneos fagorresistentes, de desarrollar en presencia de bilis de acuerdo a la metodología de Walker y Gilliland (1993), modificada ligeramente. Alícuotas de cultivos over-night de cada cepa en estudio fueron inoculadas (2%) en caldo MRS con 0,3%, 0,5% y 1,0% (p/v) de bilis (Anexo). En paralelo, las cepas fueron inoculadas en tubos conteniendo caldo MRS sin agregado de bilis (control). Los cultivos se incubaron durante 24 h a 37°C. Luego de la incubación se determinó la DO_{560} de cada cultivo y se determinó el porcentaje de crecimiento respecto al cultivo control (MRS sin bilis).

IV.6.3. Resistencia a lisozima

La lisozima presente en la cavidad oral e intestinos, es capaz de lisar ciertas especies bacterianas (Kimoto y col., 2000). Aunque las bacterias lácticas no estarían comprometidas, la variabilidad de propiedades entre cepas es grande.

Se determinó la capacidad de las cepas sensibles de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes, para desarrollar en presencia de lisozima (Vinderola y Reinheimer, 2003). Cultivos over-night (16-18 h, 42°C) de las cepas fueron inoculados (2%) en caldo MRS adicionado de 25, 50 y 100 ppm de lisozima y en caldo MRS sin el agregado de lisozima (control). Los cultivos se incubaron durante 24 h a 37°C. Luego de la incubación, se determinó la DO_{560} de cada cultivo, calculándose el porcentaje de crecimiento respecto al cultivo control (sin lisozima).

IV.6.4. Uso de prebióticos

Los microorganismos probióticos pueden ser administrados con sustancias que estimulen su desarrollo de manera selectiva. Estas sustancias o ingredientes alimenticios denominados *prebióticos*, no son digeribles en el intestino humano, pero pueden favorecer el crecimiento de bacterias probióticas en el colon. No todas las cepas son capaces de fermentar los mismos prebióticos, por lo que la elección de la sustancia prebiótica dependerá de cada caso en particular. Es necesario conocer cuáles son los prebióticos fermentados por cada cepa en particular a la hora de pensar en la formulación de alimentos probióticos adicionados de sustancias prebióticas.

Se estudió la capacidad de las cepas sensibles de *Lb. delbrueckii* y sus variantes fagorresistentes para fermentar los siguientes hidratos de carbono: inulina, xilitol, rafinosa y lactulosa. Cultivos over-night (16-18 h, 42°C) de las cepas y sus mutantes fagorresistentes, se inocularon (2%) en caldo MRS base (MRS sin glucosa) (Anexo) adicionado con cada prebiótico (2% p/v) (Anexo). Los cultivos se incubaron anaeróbicamente (Sistema Gaspak) a 37°C durante 24 h, para asegurar la fermentación de los prebióticos. Luego se midió la DO₅₆₀ de los cultivos y se determinó el porcentaje de crecimiento respecto a un cultivo control (cepas desarrolladas en caldo MRS-glucosa) (Anexo).

IV.7. Caracterización probiótica *in vitro*

IV.7.1. Capacidad de deconjugar sales biliares

Se determinó de acuerdo a Taranto y col. (1996), adaptando la metodología a las cepas en estudio. Se prepararon placas de Petri conteniendo medio de cultivo agarizado con las sales biliares seleccionadas. Se adicionaron las sales sódicas de ácidos biliares conjugados (ácido taurodeoxicólico y ácido taurocólico) (0,5% p/v) (Anexo), al agar MRS antes de ser sometido a esterilización. Las placas fueron inmediatamente usadas. Cultivos frescos en caldo MRS (16-18 h, 42°C) de las cepas y sus mutantes fagorresistentes se estriaron en los medios agarizados preparados. Las placas se incubaron en anaerobiosis (Sistema GasPak) a 37°C durante 3 días. Se

consideró que hubo deconjugación de ácidos biliares cuando se observó la presencia de un halo de precipitación (sales biliares precipitadas) alrededor de las colonias. Un control de cada cepa fue sembrado en forma de estrías en agar MRS, sin el agregado de sales biliares.

IV.7.2. Actividad de β -galactosidasa (β -gal)

Se determinó la actividad de β -galactosidasa bacteriana intracelular de acuerdo a la técnica de Miller (1972) ligeramente modificada. Se centrifugaron (12000 x g, 5 min, 5°C) cultivos frescos de las cepas sensibles de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes en fase estacionaria de desarrollo (DO_{560} aproximada de 2). Los pellets se lavaron dos veces, resuspendieron en buffer fosfato (pH 7) (Anexo) y se inocularon (1%) en caldo MRS-lactosa (Anexo). Los cultivos se incubaron a 37°C por 24 h en baño termostático. Las células se cosecharon y se lavaron dos veces de la misma manera que se detalló previamente, ajustándose luego la DO_{560} (con el mismo buffer de lavado), a un valor aproximado de 1, registrándose el valor exacto. Se permeabilizó 1 ml de esa suspensión celular con 50 μ l de solución tolueno/acetona (1:9, v/v), agitando vigorosamente con el vortex (7 min), luego de lo cual se llevó a cabo el ensayo de cuantificación de β -galactosidasa. Para esto, se colocaron 100 μ l del permeabilizado en un tubo de ensayo, se agregaron 900 μ l de buffer fosfato (pH 7) y 200 μ l de una solución recién preparada de ONPG (*o*-nitrofenil galactopiranosido) (Anexo). Los tubos se incubaron en baño termostático (37°C, 15 min). La reacción de color se detuvo agregando 0,5 ml de una solución de Na_2CO_3 (1 M). Posteriormente, se determinó la DO_{420} y DO_{560} . La actividad de β -galactosidasa se calculó (en unidades Miller) de la siguiente manera:

$$UM = 1000 \times [(DO_{420} - 1,75 \times DO_{2560}) / (15 \text{ min} \times 0,1 \text{ ml} \times DO_{1560})]$$

Donde DO_{1560} es la DO antes del ensayo (el valor exacto próximo a 1); DO_{2560} es la DO de la mezcla de reacción; 15 min es el tiempo de reacción; y 0,1 ml es el volumen de cultivo utilizado para la reacción.

IV.7.3. Hidrofobicidad

La capacidad de adhesión celular a hidrocarburos como índice de su hidrofobicidad, fue determinada según el método de Pérez y col. (1998) con algunas modificaciones. Cultivos frescos (en caldo MRS) en fase estacionaria de desarrollo de las cepas sensibles y sus mutantes espontáneos fagorresistentes, fueron centrifugados (12000 x *g*, 5 min, 5°C), lavando luego los pellets dos veces con buffer fosfato (pH 6,5). Luego se resuspendieron en el mismo buffer hasta una DO₅₆₀ de aproximadamente 1, registrándose el valor exacto. Posteriormente se pusieron en contacto 3 ml de estas suspensiones celulares con 0,6 ml de n-hexadecano, agitándose con vortex durante 120 seg. Se dejaron separar las fases (1 h, 37 C). La fase acuosa se removió cuidadosamente con aguja y jeringa, y se midió su DO₅₆₀. La disminución de este parámetro se tomó como una medida de la hidrofobicidad celular (H%), que se calculó de la siguiente manera:

$$H\% = [(DO_0 - DO) / DO_0] \times 100$$

Donde DO₀ es el valor de la absorbancia antes de la extracción con n-hexadecano; y DO es el valor de la absorbancia luego de la extracción con n-hexadecano.

IV.7.4. Inhibición de bacterias patógenas

Se investigó la capacidad de sobrenadantes libres de células (SLC) de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes, para inhibir el desarrollo de bacterias patógenas *in vitro*.

Para realizar este ensayo, se emplearon cuatro cepas de bacterias patógenas: *Salmonella* sp. OMS-Ca, *Staphylococcus aureus* 76, *Escherichia coli* V517 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, todas pertenecientes a la colección del INLAIN. El efecto del agregado de sobrenadantes libres de células (SLC) de cepas de *Lb. delbrueckii* en el desarrollo de bacterias patógenas se determinó mediante la técnica de difusión en

agar (Reinheimer y col., 1988). Los SLC fueron obtenidos por centrifugación ($12000 \times g$, 5 min, 5°C) de cultivos frescos de cada cepa o mutante ensayado, siendo esterilizados mediante filtración por membranas (diámetro de poro $0,45 \mu\text{m}$). Los SLC se mantuvieron congelados (-20°C) hasta su uso. Para la preparación de las placas conteniendo cada patógeno se utilizaron 20 ml de agar nutritivo (para *Salmonella* sp., *S. aureus* y *E. coli*) o agar BHI (para *L. monocytogenes*). Los medios agarizados fueron fundidos y termostatzados a 45°C , y luego inoculados con $200 \mu\text{l}$ de un cultivo fresco previamente ajustado a una DO_{560} de aproximadamente 0,8 de cada patógeno, excepto para *S. aureus* 76, que fue llevado a $\text{DO}_{560} = 1$. Los tubos así inoculados se agitaron en vortex y se vertieron en cajas de Petri. Con un sacabocados de vidrio previamente esterilizado, se practicaron hoyos (10 mm de diámetro) en las placas conteniendo las bacterias patógenas y en los mismos se colocaron $180 \mu\text{l}$ de cada SLC. Las placas se incubaron aeróbicamente a 37°C durante 24 h. Se consideró que no hubo inhibición del patógeno cuando se observó un crecimiento normal del mismo alrededor del hoyo. La presencia de un halo sin crecimiento de la bacteria alrededor del hoyo, fue considerada inhibición total del mismo, mientras que un desarrollo débil del patógeno alrededor del halo (una menor turbidez que en el resto de la placa) se consideró una inhibición parcial. Los halos obtenidos fueron medidos, y la inhibición fue calculada de la siguiente manera:

$$\text{Inhibición} = [\text{diámetro halo de inhibición (cm)} - \text{diámetro del hoyo (1 cm)}]$$

IV.7.5. Naturaleza química de las sustancias inhibitorias de bacterias patógenas

Con el objetivo de investigar la naturaleza química de las sustancias inhibitorias de patógenos presentes en los SLC de las cepas fago-sensibles de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagoresistentes, los SLC fueron sometidos a distintos tratamientos: calentamiento (121°C , 15 min), neutralización (NaOH), e incubación (1h, 37°C) en presencia de proteinasa K ($200 \mu\text{g/ml}$) o pepsina ($200 \mu\text{g/ml}$). Luego de estos tratamientos, los SLC fueron esterilizados por filtración (membranas de diámetro $0,45 \mu\text{m}$) y se realizó el ensayo de difusión en agar (como se detalló en el punto anterior). Asimismo, se ensayaron alícuotas de caldo MRS acidificado con ácido láctico y con HCl, hasta lograr los valores de pH alcanzados normalmente por cada una de las

cepas de *Lb. delbrueckii* estudiadas (entre 3,80 y 4,00), con el propósito de determinar la importancia de este ácido orgánico en la acción inhibitoria sobre microorganismos patógenos. Como controles, se ensayaron alícuotas de caldo MRS (pH 6,8) y SLC sin ningún tratamiento.

IV.7.6. Adhesión *in vitro* de *Lb. delbrueckii* a células eucarióticas en cultivo

Los ensayos de adhesión a células Caco-2/TC-7 fueron realizados en el Centro de Investigación y Desarrollo de Criotecnología de Alimentos (CIDCA, Universidad Nacional de La Plata - CONICET), bajo la supervisión de la Lic. Marina Golowczyc y la Dra. Graciela De Antoni.

IV.7.6.1. Preparación de las células Caco-2/TC-7

Las células Caco-2/TC-7 son obtenidas de adenocarcinoma de colon humano, y expresan múltiples marcadores característicos de células normales del intestino delgado (Coconnier y col., 1997). Son usadas rutinariamente para muchos estudios de adhesión *in vitro* de bacterias. Para su desarrollo, se utiliza un medio denominado DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium) (Anexo), suplementado con 15% (v/v) de suero de feto de ternero inactivado térmicamente (30 min, 60°C), y estreptomycin y penicilina G (concentración final 10 mg/ ml y 10 UI/ ml, respectivamente). Las células fueron distribuidas en placas de 24 hoyos, donde se incubaron (37°C) en atmósfera de 5% CO₂ – 95% aire. El medio de desarrollo de las células fue cambiado cada dos días y reemplazado por DMEM fresco. Luego de 7 días de cultivo, las células Caco-2/TC-7 llegaron a confluencia, y en ese momento fue posible utilizar las placas para los ensayos correspondientes.

IV.7.6.2. Ensayo de adhesión

La adhesión de bacterias en la superficie del epitelio intestinal se considera un criterio importante de selección de bacterias probióticas. La capacidad de adhesión se relaciona con los efectos beneficiosos que las bacterias probióticas pueden ejercer

sobre el hospedador, como estimulación del sistema inmunológico e inhibición de patógenos.

Los cultivos bacterianos fueron desarrollados durante 16-18 h en caldo MRS (37°C), centrifugados (10000 x g, 10 min, 4°C) y los pellets fueron lavados dos veces y resuspendidos en solución salina (PBS pH 7,4) (Anexo), hasta alcanzar una DO₅₆₀ cercana a 2. Se agregaron volúmenes equivalentes (250 µl) de estas suspensiones y de DMEM fresco a cada hoyo, los cuales poseían un césped de células Caco-2/TC-7 previamente desarrolladas. Las placas así sembradas fueron incubadas (1 h, 37°C) en atmósfera de 5% CO₂ - 95% aire. Luego de la incubación, los hoyos sembrados fueron lavados tres veces con PBS, y fueron adicionados de agua ultra pura estéril, provocando la lisis de las células Caco-2/TC-7. Se realizaron diluciones apropiadas de cada hoyo sembrado, en agua de peptona, y se sembraron en agar MRS. Transcurrido el período de incubación (48 h, 42°C) se realizaron los recuentos bacterianos. Asimismo, se realizó el recuento de las cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes antes de comenzar la experiencia (recuento inicial, control). Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de adhesión respecto al control:

$$\% \text{Adhesión} = [(\text{UFC/ml adheridas}) / (\text{UFC/ml iniciales})] \times 100$$

Para realizar el examen microscópico de la interacción bacteria-célula eucariota, las células Caco-2/TC-7 se cultivaron sobre vidrios portaobjetos redondos colocados en los hoyos. Luego del período de incubación, las células se lavaron (como se describió previamente), se fijaron con formol (10% v/v) y tiñeron con coloración de Gram.

IV.7.7. Inhibición de la adhesión e invasión de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis por sobrenadantes de cepas de *Lb. delbrueckii*

Esta experiencia se realizó en el Centro de Investigación y Desarrollo de Criotecnología de Alimentos (CIDCA, Universidad Nacional de La Plata - CONICET), bajo la supervisión de la Lic. Marina Golowczyc y la Dra. Graciela De Antoni.

Para realizar este ensayo, se utilizó una cepa de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis aislada en el Hospital de Pediatría Prof. Juan P. Garrahan (Buenos Aires, Argentina). Esta cepa fue desarrollada en caldo nutritivo y se incubó a 37°C durante 18 h.

Los sobrenadantes libres de células (SLC) de cada cepa sensible de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes, fueron obtenidos por centrifugación (12000 x *g*, 5 min, 5°C) de cultivos over-night (16-18 h, 37°C). Los sobrenadantes fueron esterilizados por filtración a través de membranas (Millipore, diámetro de poro 0,45 µm), y llevados a pH 4,5.

El ensayo de inhibición de *S. enterica* serovar Enteritidis se efectuó de acuerdo a trabajos previos (Coconnier y col., 1997; Coconnier y col., 2000) con algunas modificaciones. Previo a la infección, alícuotas de un cultivo de *S. enterica* serovar Enteritidis fueron sometidas a distintos tratamientos, poniéndose en contacto con SLC de cada cepa fago-sensible y los mutantes fagorresistentes, caldo MRS acidificado con ácido láctico hasta pH 4,5 (control de MRS) y solución salina (PBS pH 7,4) (control de PBS), y se incubaron durante 1 h a 37°C. El tratamiento con caldo MRS pH 4,5 tuvo como objetivo verificar si se producía muerte del patógeno en presencia de acidez. Posteriormente, las alícuotas tratadas de *S. enterica* serovar Enteritidis fueron centrifugadas y resuspendidas en PBS. Las células Caco-2/TC-7 fueron lavadas dos veces con PBS, y adicionadas de DMEM fresco antes de realizar la infección con las alícuotas tratadas del patógeno. Las placas de 24 hoyos conteniendo células Caco-2/TC-7 y *S. enterica* serovar Enteritidis tratada, fueron incubadas (1 h, 37°C) en atmósfera de 5% CO₂ - 95% aire, y luego fueron lavadas tres veces con buffer PBS.

Con el objetivo de determinar el número total de células de *S. enterica* serovar Enteritidis asociadas (bacterias patógenas extra e intracelulares), las monocapas de Caco-2/TC-7 fueron lisadas por adición de agua ultra pura estéril. Se realizaron diluciones apropiadas en agua de peptona, y se sembraron alícuotas en agar nutritivo. Luego de la incubación (24 h, 37°C), se efectuó el recuento de *S. enterica* serovar Enteritidis, y de esta manera se conoció el número total de bacterias patógenas asociadas a las monocapas celulares.

La extensión de la invasión de *S. enterica* serovar Enteritidis fue determinada adicionando un antibiótico a las monocapas. El agregado de gentamicina (200 µg/ml) destruye las bacterias patógenas que se encuentran en la superficie de las células Caco-2/TC-7, pero no es capaz de penetrar al interior de las células, por lo que los patógenos que hayan logrado invadirlas permanecerán intactos. Luego de este tratamiento, las monocapas se lavaron tres veces con PBS y se lisaron por agregado de agua ultra pura estéril. Se realizaron diluciones apropiadas, las cuales fueron sembradas en agar nutritivo e incubadas (24 h, 37°C). Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento bacteriano, y se obtuvo el número de bacterias patógenas que fue capaz de invadir a las células intestinales. El número de células de *S. enterica* serovar Enteritidis que sólo fue capaz de adherirse a la superficie de la monocapa se obtuvo por diferencia entre los recuentos totales y los recuentos del patógeno intracelular.

IV.8. Estudio *in vivo* de la capacidad inmunoestimulante de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes

Estos ensayos fueron realizados en colaboración con el Dr. Celso Vinderola y la Dra. Gabriela Perdigón, en el Centro de Referencias para Lactobacilos (CERELA, S. M. de Tucumán, Argentina).

IV.8.1. Animales y condiciones de alimentación

Se utilizaron ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de vida (25 a 30 g de peso), criados en el bioterio del CERELA. Cada grupo experimental consistió de 5 ratones que fueron dispuestos juntos en un recipiente plástico, con atmósfera controlada (temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad $55 \pm 2\%$), y un ciclo luz/oscuridad de 12 h.

Cultivos over-night de las cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes fueron centrifugados ($4000 \times g$, 15 min, 4°C), y lavados dos veces con solución salina (PBS, pH 7,4). Finalmente, los pellets de las cepas se resuspendieron en LDR (10% p/v) hasta alcanzar una concentración celular final de 10^8 UFC/ml. Al grupo de ratones tratados se les ofreció la suspensión celular de *Lb. delbrueckii* como agua

de bebida durante 2, 5 o 7 días consecutivos. A otro grupo de ratones (control), se le ofreció LDR diluida en PBS durante los mismos períodos que el grupo anterior. Tanto los ratones del grupo tratado como los del grupo control, recibieron *ad libitum* una dieta balanceada convencional estéril (230 g/kg de proteínas, 60 g/kg de fibra cruda, 100 g/kg de minerales totales, 13 g/kg de calcio, 8 g/kg fósforo, 120 g/kg de agua y vitaminas).

IV.8.2. Ensayo de traslocación

Al final del período de alimentación, los ratones fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical, y se extrajeron los hígados para determinar los posibles efectos secundarios sobre la microflora entérica normal, como traslocación a sitios extraintestinales. Los hígados fueron homogeneizados en agua de peptona, realizándose diluciones seriadas adecuadas que fueron sembradas en agar MacConkey (Anexo), para la detección de enterobacterias; y en agar LAPTg (Anexo), para la determinación de lactobacilos. Las placas fueron incubadas 48 h a 37°C en condiciones anaeróbicas o aeróbicas, respectivamente. Transcurrido el período de incubación, se observaron las placas, y los resultados se expresaron como traslocación bacteriana positiva (presencia de bacterias en las placas) o negativa (ausencia de bacterias en las placas). El hígado es un órgano que normalmente carece de bacterias.

IV.8.3. Estudio histológico del intestino

Se extrajo el intestino delgado de los animales del grupo control y del grupo que recibió las suspensiones de *Lb. delbrueckii* durante 2, 5 o 7 días consecutivos. Los intestinos se procesaron por fijación en parafina según la metodología de Sainte-Marie (Sainte-Marie, 1962). Las secciones de parafina (4 µm de espesor) fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina. El estudio de las estructuras histológicas se llevó a cabo mediante observación microscópica.

IV.9. Obtención de cepas con resistencia incrementada a bilis

IV.9.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de bilis

La CIM se definió como la mínima concentración de bilis capaz de producir la inhibición completa del cultivo bacteriano. Para su determinación, cultivos frescos (16-18 h, 42°C) de las cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes espontáneos fagorresistentes fueron inoculados (2%) en caldo MRS conteniendo diferentes concentraciones de bilis (entre 0,01 y 0,5% p/v), e incubados durante 24 h a 37°C. Posteriormente, se midió la DO_{560} , expresándose los resultados como porcentaje (%) de desarrollo respecto a un cultivo control (en MRS sin agregado de bilis) (Margolles y col., 2003). Se consideró que la inhibición fue completa cuando la DO_{560} luego de la incubación fue menor de 0,2.

IV.9.2. Obtención de derivados adaptados a bilis

Cultivos over night de las cepas sensibles a fagos y sus mutantes fagorresistentes fueron inoculados (2%) en forma sucesiva en caldo MRS conteniendo concentraciones crecientes de bilis (desde 0,05% hasta 1% p/v). Se midió la DO_{560} de los cultivos luego de 24-48 h de incubación (37°C) para cada concentración de bilis. Los resultados se expresaron de acuerdo a lo detallado anteriormente (Margolles y col, 2003).

IV.9.3. Estabilidad de los derivados adaptados a bilis

Fue estudiada siguiendo dos metodologías:

- a) Los derivados adaptados a bilis fueron sometidos a 6 repiques sucesivos en caldo MRS (24 h, 37°C), luego se hicieron recuentos de células viables en agar MRS con y sin el agregado de bilis (0,3; 0,6 ó 0,9% p/v, según correspondiera), incubando las placas a 37°C durante 48 h (Margolles y col, 2003).
- b) De acuerdo a la segunda metodología, puesta a punto durante este estudio, los derivados fueron sometidos a 6 repiques sucesivos en caldo

MRS, inoculándose posteriormente en caldo MRS adicionado de bilis (0,3; 0,6 ó 0,9% p/v, según correspondiera). Se midió la DO₅₆₀ a las 24 h y 48 h, utilizando un cultivo control (MRS sin el agregado de bilis). A las 48 h se hicieron recuentos de células viables en agar MRS, incubando las placas a 37°C durante 48 h.

Durante el estudio de la estabilidad previamente descrito (metodología b), se procedió también a comparar la morfología celular entre las cepas originales no adaptadas, y los correspondientes derivados con resistencia incrementada a bilis. Para ello, los cultivos en caldo MRS correspondientes al sexto repique para cada cepa y sus derivados estables fueron comparados entre sí.

IV.9.4. Confirmación de la fagoresistencia y tasas de adsorción

Se utilizó el Test de Turbidez para evaluar el mantenimiento o pérdida de la resistencia de los derivados estables respecto a los fagos líticos correspondientes. Cultivos en caldo MRS-Ca de los derivados se infectaron con dosis de los fagos YAB, Ib₃ y BYM, según correspondiera. En todos los casos, se utilizaron como control de desarrollo cultivos en caldo MRS-Ca de los derivados sin agregado de fago. Se realizaron tres repiques sucesivos (en caldo MRS-Ca) de cada derivado con los fagos testeados, llevando a cabo todas las incubaciones a 42°C hasta desarrollo adecuado de los cultivos control.

Adicionalmente, se determinó el nivel de adsorción de los respectivos fagos sobre cada derivado estable obtenido y sobre las cepas originales sin adaptar (controles), según la metodología detallada en el punto III.7 de esta Sección.

IV.9.5. Curvas de crecimiento

Se evaluó el desarrollo de los derivados adaptados a bilis obtenidos, cuando se los incubó (37°C) en caldo MRS con y sin el agregado de bilis. Cultivos de los derivados adaptados a bilis en fase exponencial de desarrollo, fueron inoculados (2%) en

recipientes conteniendo caldo MRS con y sin el agregado de diferentes concentraciones de bilis (0,3 y 0,9% p/v). El cultivo control correspondió a las cepas originales (sin adaptación a bilis) inoculadas (2%) en caldo MRS con y sin el agregado de bilis. Luego de una agitación suave, el contenido de cada recipiente se distribuyó en tubos de hemólisis estériles (alícuotas de 3 ml), que se incubaron en baño termostático a 37°C. Los tubos fueron agitados periódicamente, y a intervalos de tiempo prefijados, se efectuaron mediciones de DO_{560} en espectrofotómetro. Con estos datos se construyeron las curvas de desarrollo en función del tiempo, para cada condición.

IV.9.6. Actividad acidificante y proteolítica

Se estudiaron las propiedades acidificante (pH y % de ácido láctico) y proteolítica (OPA Test) de los derivados adaptados a bilis, de acuerdo a las técnicas descritas en las Secciones IV.5.1 y IV.5.2, comparándolas con las correspondientes a las cepas de las cuales fueron obtenidos.

RESULTADOS

I. CARACTERIZACIÓN DE LOS BACTERIOFAGOS

I.1. Microscopía electrónica

- ♦ **Fago YAB:** posee una cabeza isométrica de $57,5 \pm 1,3$ nm de diámetro, y una cola de $251,0 \pm 5,3$ nm de longitud y $7,0 \pm 0,5$ nm de diámetro (Fig. 6 A).
- ♦ **Fago Ib₃:** presenta una cabeza isométrica de $54,0 \pm 2,4$ nm de diámetro, y una cola de $272,0 \pm 4,0$ nm de longitud y $9,0 \pm 0,2$ nm de diámetro (Fig. 6 B).
- ♦ **Fago BYM:** presenta una cabeza isométrica de $50,0 \pm 1,6$ nm de diámetro y una cola de aproximadamente $181,0 \pm 2,0$ nm de largo y $5,9 \pm 0,2$ nm de diámetro. Este fago presenta la particularidad de poseer una estructura de collar, la cual es bastante frecuente en fagos infectivos del género *Lactobacillus* (Fig. 6 C).

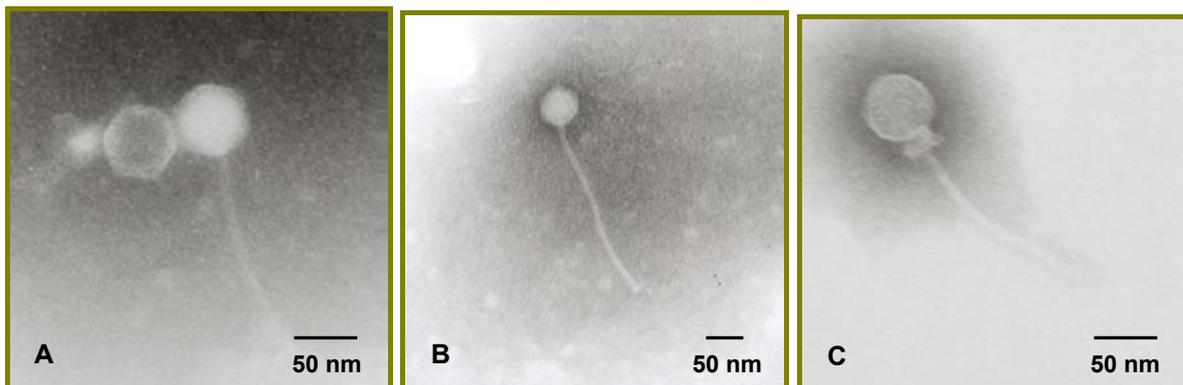


Fig. 6. Micrografías electrónicas de los fagos YAB (A), Ib₃ (B) y BYM (C).

I.2. Caracterización molecular

I.2.2. Perfiles de Restricción

Se analizaron los genomas de los tres fagos autóctonos estudiados, efectuando una restricción con las enzimas *EcoRV*, *SalI*, *XhoI*, *HindIII* y *BglII*. El tamaño de los genomas se estimó en $34,0 \pm 1,9$ kb, $31,0 \pm 1,9$ kb y de $33,0 \pm 1,3$ kb para los fagos YAB,

Ib₃ y BYM, respectivamente. Los mismos fueron estimados por la sumatoria de los tamaños de los fragmentos generados a partir de las enzimas de restricción utilizadas (Figs. 7 y 8).

Analizando las Figs. 7 y 8, podemos deducir que los tres fagos autóctonos son distintos, ya que poseen patrones de restricción diferentes con todas las enzimas utilizadas, aún cuando poseen algunas bandas en común (BYM y YAB comparten las de 3,3 y 5,2 kb, mientras que YAB e Ib₃ poseen en común las bandas de 2,9 y 4,3 kb, Fig. 7).

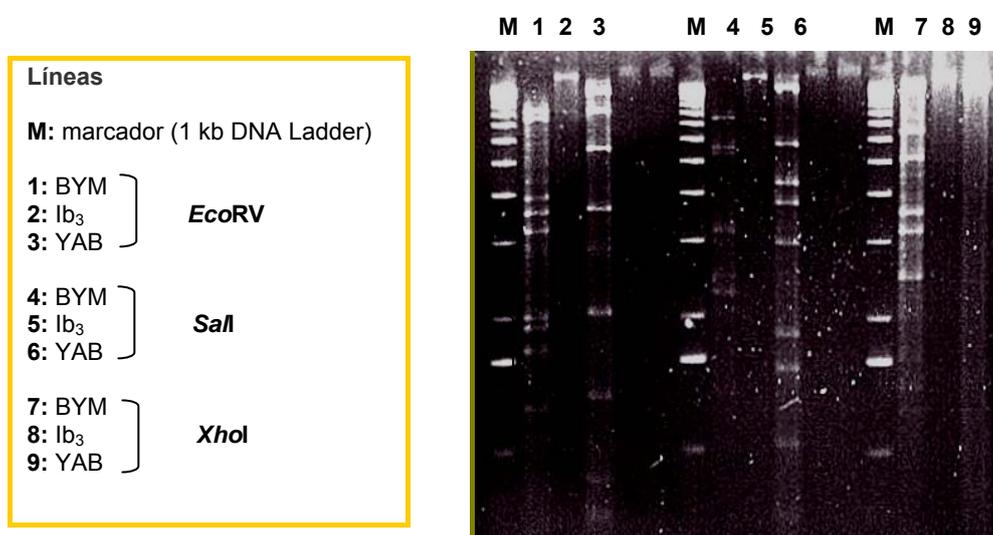


Fig. 7. Perfiles de restricción del ADN (electroforesis en gel de agarosa 0,8%) de los fagos BYM, Ib₃ y YAB, obtenidos con las endonucleasas *EcoRV*, *SalI* y *XhoI*.

1.2.3. Sitios de empaquetamiento (*cos-*, *pac-* sites)

Para determinar la naturaleza de los sitios de empaquetamiento, el ADN fágico ligado o no, se sometió a digestiones con endonucleasas de restricción y posterior tratamiento térmico. Los perfiles electroforéticos obtenidos con la muestra de ADN ligado y no ligado se compararon. Como puede observarse en la Fig. 8, en el caso del fago YAB, no se observan fragmentos submolares con ninguna de las dos enzimas utilizadas (se ven las mismas bandas para el ADN ligado y sin ligar), por lo que puede decirse que el ADN de este fago no posee extremos cohesivos. Para el fago Ib₃ se

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

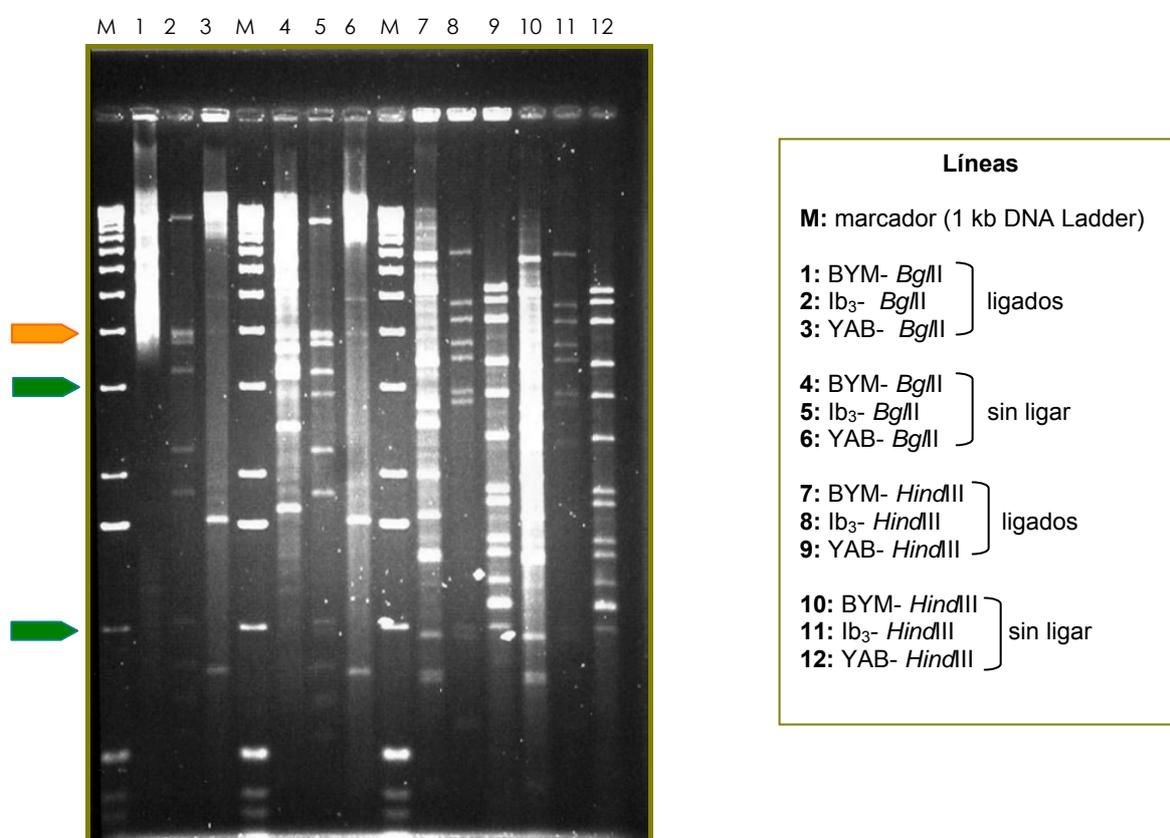


Fig. 8. Perfiles de restricción del ADN (electroforesis en gel de agarosa 0,8%), ligados y sin ligar, de los fagos BYM, lb₃ y YAB, obtenidos con las endonucleasas *Bgl*II y *Hind*III. Se indican las posiciones del fragmento de 4 kb (flecha anaranjada), y los fragmentos de 2,9 y 1 kb (flechas verdes) que aparecen en los perfiles ligado y sin ligar, respectivamente, del ADN del fago lb₃.

II. AISLAMIENTO DE MUTANTES ESPONTÁNEOS FAGORRESISTENTES A PARTIR DE CEPAS SENSIBLES A FAGOS

Cuando se utilizó la metodología de *cultivos secundarios* (CS), se aislaron 20 mutantes presuntivos usando el fago BYM, 23 variantes presuntamente fagorresistentes cuando se utilizó el fago YAB, y 33 cuando se usó el fago Ib₃.

En cambio, a partir de *medio agarizado* (MA), se aislaron 5, 6 y 7 variantes presuntamente fagorresistentes cuando se usaron los fagos BYM, YAB e Ib₃, respectivamente.

II. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO FAGORRESISTENCIA

III.1. Confirmación de la fagorresistencia y eficiencia de recuperación de mutantes fagorresistentes

Todos los mutantes presuntivos aislados fueron sometidos al Test de Turbidez para confirmar su fagorresistencia (Sección III de Materiales y Métodos). Aquellos clones aislados cuyo fenotipo fagorresistencia se mantuvo en el tiempo, fueron considerados verdaderos mutantes espontáneos fagorresistentes. Por el contrario, aquellos que perdieron el fenotipo a lo largo de las experiencias confirmatorias, se consideraron falsos mutantes fagorresistentes y se descartaron.

En general, se observó una mayor recuperación de mutantes fagorresistentes confirmados cuando se utilizó la metodología de *cultivos secundarios* en comparación con *medio agarizado* (Tabla 4).

Considerando ambas metodologías, fue posible aislar un total de 49 mutantes presuntivos a partir de *Lb. delbrueckii* YSD V cuando se usó el fago BYM, de los cuales sólo 12 (24%) fueron confirmados como tales. La totalidad de los mutantes fagorresistentes verdaderos (confirmados) que se aislaron usando el fago BYM provinieron de la metodología de CS. A pesar del gran número de clones aislados

originalmente, sólo un pequeño número de mutantes resultó ser realmente resistente al fago BYM.

A partir de *Lb. delbrueckii* Ab₁, fue posible aislar un total de 29 variantes presuntivas utilizando el fago YAB, de las cuales 20 (69%) fueron confirmadas como verdaderos mutantes fagorresistentes. La mayoría de los mutantes presuntivos lisó en el 2º repique del Test de confirmación de la fagorresistencia (Test de Turbidez), por lo que fueron descartados. La eficacia de recuperación de variantes espontáneas fagorresistentes fue más elevada que en el caso del sistema *Lb. delbrueckii* YSD V/ fago BYM.

Por otro lado, se aislaron 12 (30%) mutantes verdaderos de un total de 40 variantes presuntamente fagorresistentes a partir de *Lb. delbrueckii* Ib₃, utilizando el fago Ib₃. La gran mayoría de los clones aislados resultó ser sensible al fago Ib₃, lisando en el 2º o 3º repique del Test de confirmación de la fagorresistencia (Test de Turbidez). En consecuencia, fue necesario aislar gran cantidad de colonias de modo de aumentar las probabilidades de reunir un número aceptable de mutantes fagorresistentes verdaderos.

Tabla 4. Mutantes espontáneos fagorresistentes obtenidos a partir de cepas fago-sensibles de *Lb. delbrueckii*, mediante cultivos secundarios (CS) y en medio agarizado (MA).

Cepa sensible (<i>Lb. delbrueckii</i>)	Fago lítico	Nº de mutantes fagorresistentes				Eficiencia de recuperación de mutantes confirmados (%)	
		Presuntivos		Confirmados			
		CS	MA	CS	MA	CS	MA
YSD V	BYM	44	5	12	0	24	0
Ab₁	YAB	23	6	19	1	83	17
Ib₃	Ib ₃	33	7	10	2	30	29

III.2. Espectro de hospedadores de los mutantes fagorresistentes

Cuando los mutantes obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* Ab₁ fueron puestos en contacto con los fagos Ib₃ o BYM, resistieron los tres repiques sucesivos sin presentar lisis. Lo mismo ocurrió para los mutantes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* Ib₃, los cuales demostraron resistencia a los fagos YAB y BYM. Por su parte, las variantes de *Lb. delbrueckii* YSD V fueron también resistentes a los fagos YAB e Ib₃.

III.3. Estabilidad de la fagorresistencia

Se observó una elevada estabilidad del fenotipo fagorresistencia en los mutantes obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* YSD V (> 7 repiques) y *Lb. delbrueckii* Ab₁ (6 repiques) (Tabla 5). La estabilidad fue más heterogénea para las variantes aisladas a partir de *Lb. delbrueckii* Ib₃, observándose que sólo el 41,7% de estos mutantes resistieron hasta el séptimo repique.

Tabla 5. Estabilidad de la fagorresistencia de los mutantes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* YSD V, Ab₁ e Ib₃ (% de mutantes que resistieron sucesivos repiques en presencia de fagos, sin perder el fenotipo).

Mutantes aislados de <i>Lb. delbrueckii</i> (cepa)	Fago	Número de repiques						
		1	2	3	4	5	6	7
YSD V (n _R = 12)	BYM	100	100	100	100	100	100	100
Ab₁ (n _R = 20)	YAB	100	100	100	100	100	100	95
Ib₃ (n _R = 12)	Ib ₃	100	100	100	83,3	41,7	41,7	41,7

n_R: Número de mutantes espontáneos fagorresistentes confirmados, aislados a partir de las respectivas cepas sensibles.

III.4. Nivel de fagorresistencia (EOP)

Los valores de EOP obtenidos resultaron menores a $4,4 \cdot 10^{-8}$, indicando que los fagos no fueron capaces de formar placas de lisis en medio agarizado cuando fueron titulados sobre los mutantes fagorresistentes (Tabla 6). Estos valores de EOP obtenidos revelaron un nivel de fagorresistencia elevado con relación a sus respectivas cepas madres.

III.5. Lisogenia

No fue posible detectar fagos libres en los sobrenadantes de los cultivos pertenecientes a los mutantes espontáneos fagorresistentes aislados, cuando aquellos fueron ensayados sobre la cepa sensible correspondiente (Tabla 6).

Tabla 6. Nivel de resistencia fágica (EOP), y mecanismos de resistencia implicados (lisogenia y bloqueo en la adsorción) en los mutantes espontáneos fagorresistentes obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* YSD V, Ab₁ e Ib₃.

Mutantes aislados de <i>Lb. delbrueckii</i> (cepa)	Fago	EOP	Lisogenia	% Adsorción
YSD V (n _R = 12)	BYM	$< 3,5 \cdot 10^{-8}$	-	98,86 ± 0,35 ^a
Ab ₁ (n _R = 20)	YAB	$< 4,4 \cdot 10^{-8}$	-	0 – 34,05
Ib ₃ (n _R = 12)	Ib ₃	$< 4,3 \cdot 10^{-8}$	-	0 – 91,24

^a: Valor promedio de tres determinaciones ± desviación standard.

n_R: Número de mutantes espontáneos fagorresistentes confirmados, aislados a partir de las respectivas cepas sensibles.

III.6. Tasas de adsorción

La totalidad de las variantes fagorresistentes aisladas a partir de *Lb. delbrueckii* YSD V (usando el fago BYM), exhibieron tasas de adsorción muy altas, con valores superiores al 98% (Fig. 9). Por el contrario, en el caso de los mutantes obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* Ab₁ (usando el fago YAB), se obtuvieron tasas de adsorción muy bajas o nulas, oscilando entre 0 y 20% en el 85% de los mutantes, y entre 20 y 34% de adsorción para el 15% restante. Los valores obtenidos para las variantes fagorresistentes aisladas a partir de *Lb. delbrueckii* Ib₃ fueron muy variables, siendo muy bajos en algunos casos (entre 0 y 20% de adsorción para el 42% de los mutantes), muy elevado (entre 60 y 91% de adsorción para otro 42% de mutantes), y moderado en otros casos (entre 20 y 60% en el 16% de los mutantes). Todas las cepas sensibles (*Lb. delbrueckii* YSD V, Ab₁ e Ib₃) presentaron tasas de adsorción mayores a 99%.

Particularmente, un grupo de mutantes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* Ib₃ (usando el fago Ib₃) presentó, en un principio, una estabilidad de la fagorresistencia moderada, lisando en el 4° o 5° repique en el ensayo de estabilidad. Por las características observadas inicialmente, estos mutantes fueron congelados (a -20°C y -80°C). Posteriormente, estas variantes fagorresistentes fueron descongeladas y estudiadas respecto a la adsorción, usando el fago Ib₃. Los niveles de adsorción obtenidos fueron heterogéneos, observándose tasas relativamente elevadas (entre 60 y 90%) para aquellos mutantes cuya estabilidad del fenotipo fagorresistencia había sido menor (4° - 5° repique). Los mutantes cuyas tasas de adsorción fueron elevadas, fueron enfrentados nuevamente al fago Ib₃, y esta vez se observó lisis de los cultivos. Por los resultados expuestos, se corroboró que un grupo de los mutantes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* Ib₃ sufrió la reversión del fenotipo fagorresistencia al ser congelados y posteriormente descongelados. Este hecho no resulta extraño si se observa la moderada estabilidad de la fagorresistencia (4° - 5° repiques) obtenida inicialmente, sumado a tasas de adsorción elevadas.

Cabe destacar que el resto de los mutantes obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* Ib₃ no sufrió reversión del fenotipo fagorresistencia, la cual sólo se verificó para un pequeño grupo. Por otro lado, la totalidad de los mutantes confirmados, aislados a

partir de *Lb. delbrueckii* Ab₁ y de *Lb. delbrueckii* YSD V, mantuvieron el fenotipo fagorresistencia al ser congelados y posteriormente descongelados.

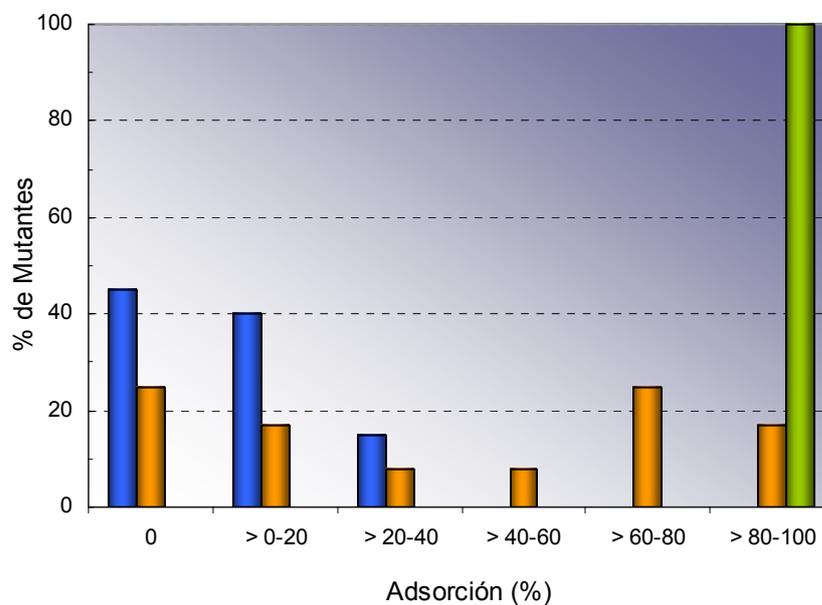


Fig. 9. Distribución porcentual de las tasas de adsorción (% de partículas fágicas adsorbidas a 42°C - 30 min) exhibidas por los mutantes espontáneos fagorresistentes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* YSD V (n_R = 12) (■), *Lb. delbrueckii* Ab₁ (n_R = 20) (■) y *Lb. delbrueckii* Ib₃ (n_R = 12) (■) bajo presión selectiva de los fagos BYM, YAB e Ib₃, respectivamente.

IV. CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES FAGORRESISTENTES

IV.1. Morfología

Las colonias de los mutantes fagorresistentes presentaron similar aspecto que el de las cepas madres de las cuales fueron obtenidos. Asimismo, la morfología celular observada al microscopio óptico fue coincidente con la de las cepas sensibles correspondientes (Figs. 10, 11 y 12).

Particularmente, *Lb. delbrueckii* Ab₁ exhibió una morfología heterogénea. Las colonias obtenidas en agar MRS fueron de dos tipos, unas opacas, de bordes irregulares (R), y las segundas cremosas, de bordes lisos (L). Al microscopio óptico, se observaron bacilos rectos y finos en las primeras, y bacilos curvos, algunos “enrulados” en las segundas (Fig. 10 A). Cuando los dos tipos de colonias fueron aisladas de agar MRS e inoculados en tubos con caldo MRS, se observó un desarrollo característico para cada una de ellas. Las colonias R aglutinaron en el fondo del tubo, mientras que las colonias L desarrollaron de manera homogénea en todo el tubo. Sin embargo, cuando se intentó realizar estrías sucesivas de cada una de ellas, sólo se consiguió obtener una mezcla de ambos tipos de colonias.

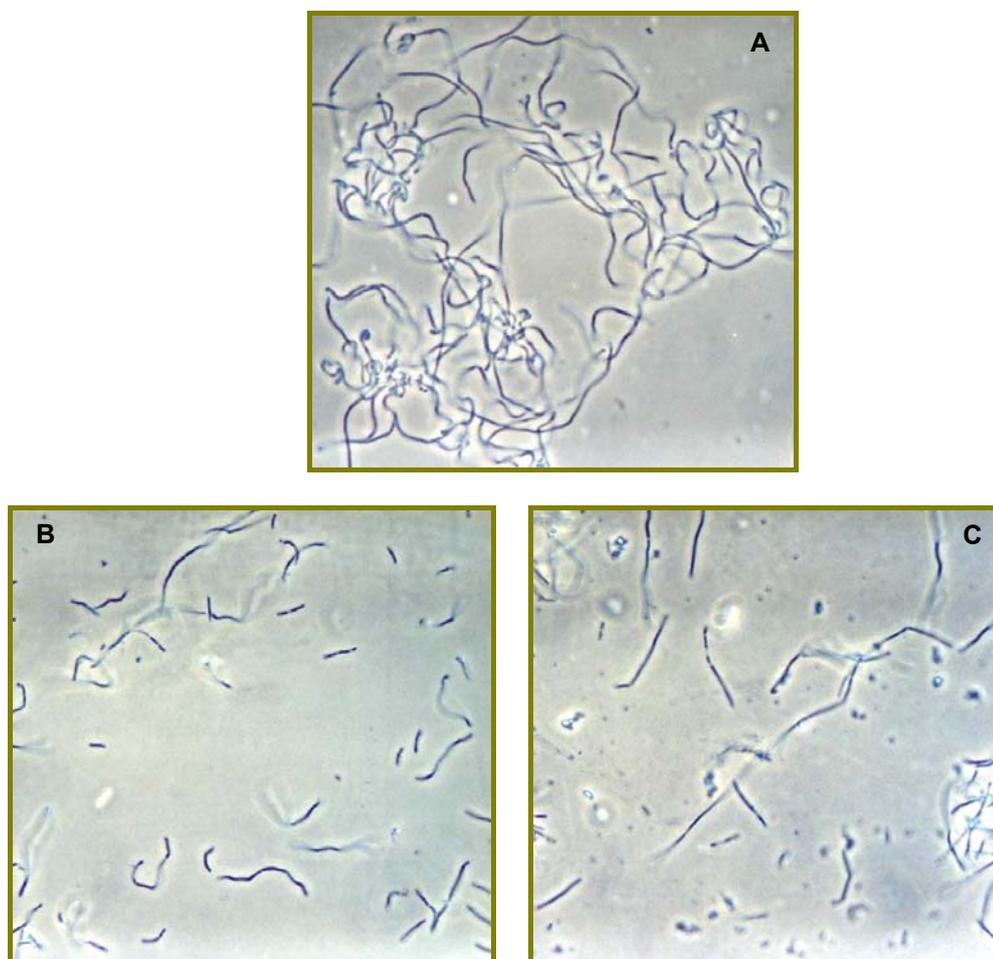


Fig. 10. Morfología celular de la cepa fago-sensible *Lb. delbrueckii* Ab₁ (A), y sus mutantes espontáneos fagorresistentes A₇ (B) y A₁₇ (C). Fotografías obtenidas por observación en microscopio óptico de contraste de fases (1000 x).



Fig. 11. Morfología celular de la cepa fago-sensible *Lb. delbrueckii* YSD V (A), y su mutante espontáneo fagorresistente V₂ (B). Fotografías obtenidas por observación en microscopio óptico de contraste de fases (1000 x).

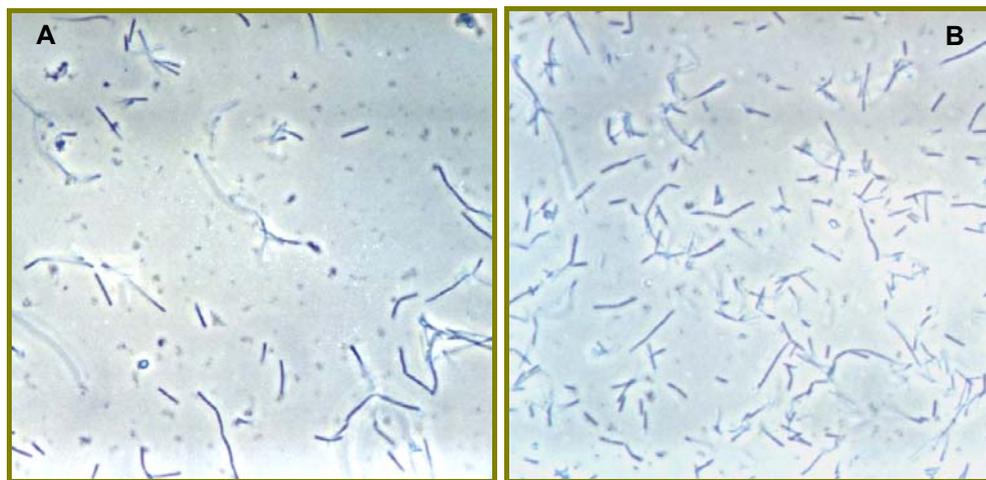


Fig. 12. Morfología celular de la cepa fago-sensible *Lb. delbrueckii* lb₃ (A), y su mutante espontáneo fagorresistente l₃₉ (B). Fotografías obtenidas por observación en microscopio óptico de contraste de fases (1000 x).

IV.2. Perfil fermentativo de azúcares

El perfil fermentativo de azúcares de los tres grupos de mutantes aislados resultó similar al de sus correspondientes cepas sensibles, confirmando su pertenencia a las respectivas especies y subespecies de *Lactobacillus* (datos no mostrados).

IV.3. Estudios genéticos

IV.3.1. PCR- ARDRA

Lb. delbrueckii Ab₁, *Lb. delbrueckii* Ib₃, sus respectivos mutantes y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 12315^T revelaron, luego de la restricción con *EcoRI*, una banda de aproximadamente 1,4 kb (Fig. 13). De esta manera, las cepas Ab₁ e Ib₃ (así como sus mutantes correspondientes) fueron clasificados como *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. Por otro lado, *Lb. delbrueckii* YSD V y sus mutantes, así como *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842^T revelaron, luego de la restricción, dos fragmentos de aproximadamente 0,6 y 0,8 kb, por lo que la cepa YSD V y sus mutantes espontáneos fueron clasificados como *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

IV.3.2. Perfiles RAPD-PCR

En un primer momento, se confeccionaron dos agrupaciones independientes, que correspondieron a los dos primers usados (M13 y 1254). Estos clusters fueron contruidos agrupando los perfiles obtenidos en la amplificación con cada uno de los primers utilizados. No obstante, la resolución obtenida no fue satisfactoria. Por esto, posteriormente se realizó una única agrupación, combinando los perfiles obtenidos con ambos primers usados (Fig. 14). De esta manera, se obtuvieron tres clusters bien definidos, correspondientes a los tres grupos de mutantes y sus respectivas cepas madres. Para cada cluster, se obtuvo un coeficiente de similitud mayor al 94%, revelando una gran homología genética entre las cepas sensibles y sus correspondientes mutantes fagorresistentes, corroborando que los mismos derivan

efectivamente de las respectivas cepas sensibles, no siendo el producto de contaminaciones.

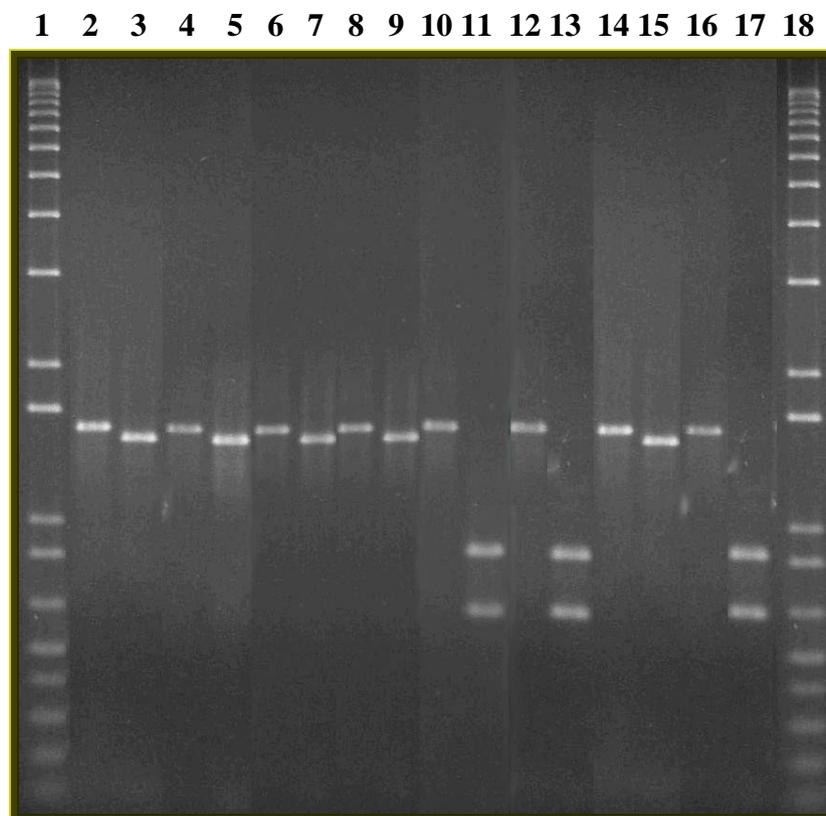


Fig. 13. Perfiles PCR-ARDRA de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ e Ib₃, y de algunos de sus mutantes fagorresistentes, digeridos (líneas 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17) o no digeridos (líneas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) con *Eco*RI. Líneas 2 y 3: cepa fago-sensible Ab₁, Líneas 4 y 5: mutante de Ab₁, Líneas 6 y 7: cepa fago-sensible Ib₃, Líneas 8 y 9: mutante de Ib₃, Líneas 10 y 11: cepa fago-sensible YSD V, Líneas 12 y 13: mutante de YSD V, Líneas 14 y 15: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 12315^T, Líneas 16 y 17: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842^T, Líneas 1 y 18: marcador de peso molecular 1 kbp Plus DNA Ladder.

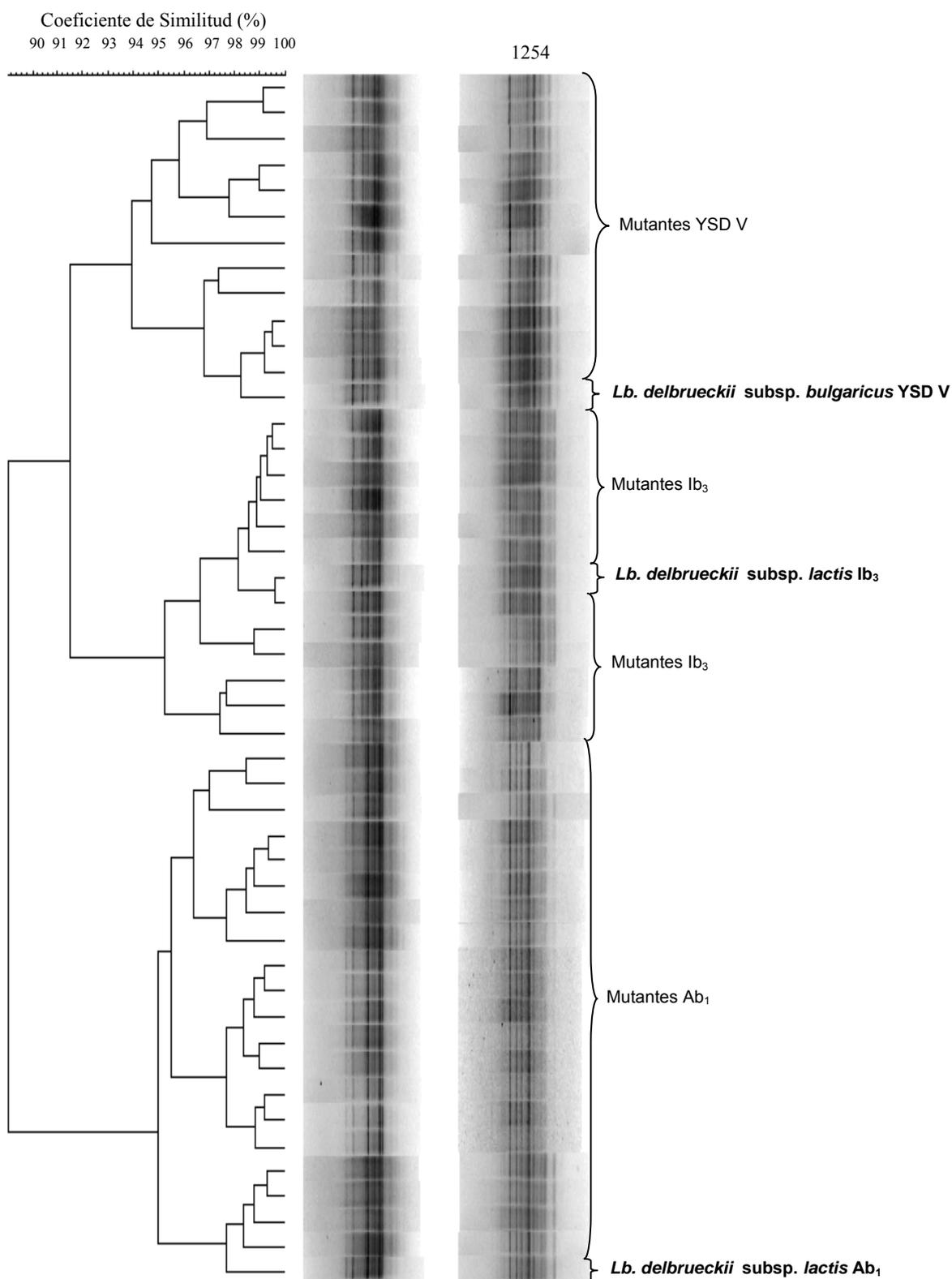


Fig. 14. Dendrograma obtenido por comparación (BioNumerics™ V 3.0, Applied Maths BVBA, Bélgica) y reagrupamiento (UPGMA: Unweight Pair Group Method with Arithmetic Averages) de los perfiles RAPD-PCR de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* lb₃, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus respectivos mutantes fagorresistentes, usando los primers M13 y 1254.

IV.4. Análisis de las proteínas de pared mediante SDS-PAGE

El análisis de las proteínas de la pared celular de las cepas de *Lb. delbrueckii* YSD V, lb₃ y Ab₁ se utilizó como metodología confirmatoria de la identificación realizada previamente por métodos fenotípicos (fermentación de azúcares) y moleculares.

El estudio mediante SDS-PAGE reveló dos tipos de perfiles (Fig. 15). El primer grupo presentó una proteína con una masa molecular aproximada de 31 kDa, o dos proteínas de 30 y 31 kDa, también denominado “doblete”. Este tipo de perfil fue encontrado para la cepa control *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ILC 333, y para *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V. El segundo grupo reveló perfiles conformados por una única proteína con una masa molecular de 18 kDa. Este grupo incluyó a la cepa control *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ILC 232, así como a *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* lb₃ y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁.

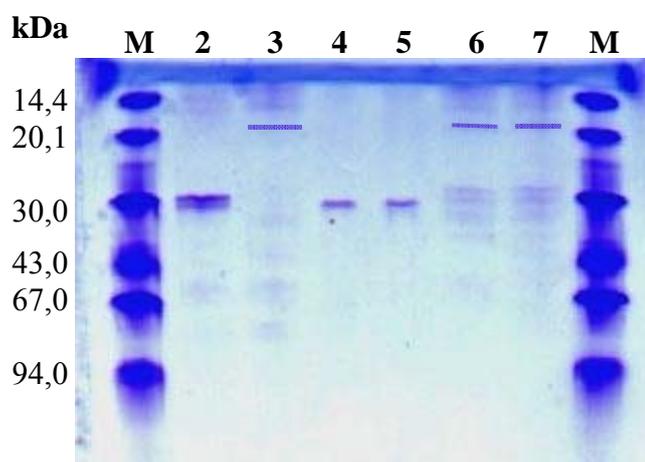


Fig. 15. Perfiles de proteínas de la superficie de pared celular obtenidos por SDS-PAGE. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ILC 333 (línea 2), *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ILC 232 (línea 3), *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (líneas 4 y 5), *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* lb₃ y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ (líneas 6 y 7, respectivamente). M: Marcador de peso molecular.

IV.5. Caracterización tecnológica

IV.5.1. Actividad acidificante y proteolítica

En las Tablas 7, 8 y 9 se muestran los valores de pH obtenidos, así como los valores de actividad acidificante y proteolítica cuando los tres grupos de mutantes fueron desarrollados en LDR durante 24 h a 42°C.

El análisis del pH de los cultivos permitió observar distintos comportamientos en los tres grupos de mutantes analizados. Las variantes aisladas a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ fueron clasificadas en dos grupos (Tabla 7). El primer grupo estuvo constituido por mutantes que alcanzaron valores de pH similares al de la cepa madre (pH $3,98 \pm 0,10$), y se denominaron variantes "rápidas" (pH $4,02 \pm 0,07$) ($n_R = 13$). El segundo grupo estuvo formado por aquellas variantes que no coagularon la leche, desarrollando valores de pH marcadamente superiores al de la cepa madre, clasificándolos como variantes "lentas" (pH $5,86 \pm 0,10$) ($n_R = 7$). Por el contrario, la totalidad de los mutantes fagorresistentes obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ presentaron valores de pH ($4,01 \pm 0,07$) ($n_R = 12$) comparables a los encontrados para la cepa madre ($3,96 \pm 0,16$) (Tabla 8). Algo similar se observó en el caso de los mutantes espontáneos aislados a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, siendo capaces de descender el pH de manera similar ($4,03 \pm 0,08$) ($n_R = 12$) a su correspondiente cepa madre ($4,07 \pm 0,02$) (Tabla 9). Por lo tanto, la totalidad de los mutantes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V ($n_R = 12$) y de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ ($n_R = 12$) fueron clasificados como variantes "rápidas".

Los valores de actividad acidificante y proteolítica de las variantes "rápidas" aisladas a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ fueron elevados ($1,60 \pm 0,08$ % de ácido láctico; $A_{340} 0,58 \pm 0,10$, respectivamente) ($n_R = 13$) y similares a los encontrados para su correspondiente cepa madre ($1,76 \pm 0,09$ % de ácido láctico; $A_{340} 0,56 \pm 0,05$). En cambio, las variantes "lentas" revelaron valores de actividad acidificante y proteolítica muy inferiores ($0,33 \pm 0,03$ % de ácido láctico; $A_{340} 0,09 \pm 0,02$) ($n_R = 7$).

Todos los mutantes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ presentaron actividad acidificante y proteolítica elevadas ($1,38 \pm 0,09\%$ de ácido láctico; $A_{340} 0,48 \pm 0,07$) ($n_R = 12$) al igual que su cepa madre ($1,44 \pm 0,06\%$ de ácido láctico; $A_{340} 0,55 \pm 0,01$). Lo mismo ocurrió con las variantes fago resistentes aisladas a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, cuya totalidad presentó elevada capacidad acidificante y proteolítica ($1,22 \pm 0,11\%$ de ácido láctico; $A_{340} 0,34 \pm 0,04$) ($n_R = 12$), de manera similar a la cepa fago-sensible de la cual fueron obtenidas ($1,14 \pm 0,01\%$ de ácido láctico; $A_{340} 0,49 \pm 0,05$).

Las Figs. 16, 17 y 18 representan la distribución de los mutantes de acuerdo a las propiedades tecnológicas obtenidas (pH medido a las 24 h, producción de ácido láctico y actividad proteolítica). Para las variantes "rápidas" de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁, puede observarse que, a un rango relativamente estrecho de pH (3,8- 4,2) corresponden , sin embargo, rangos amplios de valores de actividad acidificante (1,4- 1,8% de ácido láctico) y actividad proteolítica (A_{340} entre 0,400- 0,800). Algo similar se observó para la totalidad de las variantes fagorresistentes de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, las cuales presentaron rangos de pH estrechos (3,8- 4,2 en ambos casos), con rangos amplios de actividad acidificante (entre 1,2-1,6 y 1,0-1,4 de ácido láctico, respectivamente), y de actividad proteolítica (entre 0,25-0,80 y 0,25-0,55, respectivamente).

Tabla 7. Actividad acidificante y proteolítica de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus mutantes espontáneos fagorresistentes, a partir de cultivos en LDR (24 h, 42°C).

Tipo de variante espontánea fagorresistente	Cepa sensible / Mutante	pH ^a	Actividad	Actividad
			Acidificante ^a (% ácido láctico)	Proteolítica ^a (OPA Test, A ₃₄₀)
	Ab₁	3,98 ± 0,10	1,76 ± 0,09	0,56 ± 0,05
Variantes "rápidas" ^b	A ₅	4,02 ± 0,25	1,59 ± 0,03	0,42 ± 0,03
	A ₇	3,92 ± 0,10	1,72 ± 0,07	0,53 ± 0,05
	A ₈	4,12 ± 0,23	1,57 ± 0,06	0,55 ± 0,07
	A ₁₀	4,01 ± 0,11	1,63 ± 0,04	0,79 ± 0,10
	A ₁₁	4,05 ± 0,13	1,59 ± 0,03	0,67 ± 0,09
	A ₁₂	4,02 ± 0,14	1,63 ± 0,19	0,67 ± 0,08
	A ₁₃	4,18 ± 0,15	1,53 ± 0,10	0,63 ± 0,01
	A ₁₄	4,02 ± 0,10	1,57 ± 0,10	0,53 ± 0,07
	A ₁₅	4,01 ± 0,10	1,72 ± 0,10	0,46 ± 0,02
	A ₁₈	3,97 ± 0,18	1,72 ± 0,04	0,59 ± 0,03
	A ₁₉	4,01 ± 0,13	1,57 ± 0,09	0,49 ± 0,03
	A ₂₁	4,00 ± 0,02	1,44 ± 0,07	0,59 ± 0,01
	A ₂₄	3,93 ± 0,05	1,55 ± 0,10	0,60 ± 0,05
Variantes "lentas" ^b	A ₁₇	5,66 ± 0,15	0,36 ± 0,01	0,08 ± 0,01
	A ₂₀	5,92 ± 0,11	0,27 ± 0,02	0,088 ± 0,01
	A ₂₅	5,91 ± 0,16	0,29 ± 0,01	0,07 ± 0,01
	A ₂₆	5,82 ± 0,13	0,35 ± 0,06	0,06 ± 0,02
	A ₂₇	5,86 ± 0,43	0,38 ± 0,04	0,13 ± 0,05
	A ₂₈	5,96 ± 0,13	0,31 ± 0,02	0,10 ± 0,06
	A ₂₉	5,89 ± 0,07	0,33 ± 0,03	0,09 ± 0,01

^a: Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones ± desviación standard.

^b: Clasificación de los mutantes, según el pH alcanzado por los cultivos en LDR (24 h, 42°C).

Tabla. 8. Actividad acidificante y proteolítica de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y sus mutantes espontáneos fagorresistentes, a partir de cultivos en LDR (24 h, 42°C).

Cepa sensible / Mutante	pH ^a	Actividad Acidificante ^a (% ácido láctico)	Actividad Proteolítica ^a (OPA Test, A ₃₄₀)
Ib₃	3,96 ± 0,16	1,44 ± 0,06	0,55 ± 0,01
I ₃	3,90 ± 0,01	1,49 ± 0,01	0,48 ± 0,02
I ₉	4,07 ± 0,40	1,32 ± 0,04	0,37 ± 0,06
I ₁₀	3,96 ± 0,18	1,47 ± 0,10	0,48 ± 0,03
I ₁₁	3,95 ± 0,12	1,49 ± 0,10	0,44 ± 0,02
I ₂₃	4,07 ± 0,10	1,28 ± 0,04	0,45 ± 0,02
I ₂₈	4,06 ± 0,07	1,30 ± 0,07	0,36 ± 0,01
I ₂₉	3,89 ± 0,07	1,57 ± 0,07	0,62 ± 0,09
I ₃₀	4,02 ± 0,02	1,36 ± 0,01	0,44 ± 0,09
I ₃₂	4,10 ± 0,12	1,32 ± 0,02	0,52 ± 0,05
I ₃₃	4,00 ± 0,10	1,40 ± 0,11	0,56 ± 0,01
I ₃₈	4,05 ± 0,10	1,32 ± 0,06	0,50 ± 0,02
I ₃₉	4,03 ± 0,06	1,34 ± 0,04	0,58 ± 0,04

^a: Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones ± desviación standard.

Tabla 9. Actividad acidificante y proteolítica de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y sus mutantes espontáneos fagorresistentes, a partir de cultivos en LDR (24 h, 42°C).

Cepa sensible / Mutante	pH ^a	Actividad Acidificante ^a (% ácido láctico)	Actividad Proteolítica ^a (OPA Test, A ₃₄₀)
YSD V	4,07 ± 0,02	1,14 ± 0,01	0,49 ± 0,05
V ₂	4,00 ± 0,02	1,13 ± 0,03	0,41 ± 0,02
V ₃	4,07 ± 0,16	1,11 ± 0,01	0,39 ± 0,03
V ₆	4,02 ± 0,21	1,13 ± 0,04	0,40 ± 0,01
V ₁₀	4,09 ± 0,10	1,05 ± 0,03	0,28 ± 0,01
V ₁₁	3,93 ± 0,06	1,23 ± 0,02	0,35 ± 0,05
V ₁₂	4,09 ± 0,16	1,10 ± 0,04	0,29 ± 0,02
V ₁₃	4,19 ± 0,27	1,34 ± 0,01	0,32 ± 0,01
V ₁₄	3,94 ± 0,06	1,34 ± 0,01	0,37 ± 0,02
V ₁₅	3,93 ± 0,12	1,38 ± 0,06	0,38 ± 0,01
V ₁₇	4,09 ± 0,12	1,32 ± 0,07	0,33 ± 0,05
V ₂₇	4,01 ± 0,08	1,21 ± 0,01	0,28 ± 0,01
V ₂₉	3,98 ± 0,01	1,32 ± 0,04	0,36 ± 0,01

^a: Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones ± desviación standard.

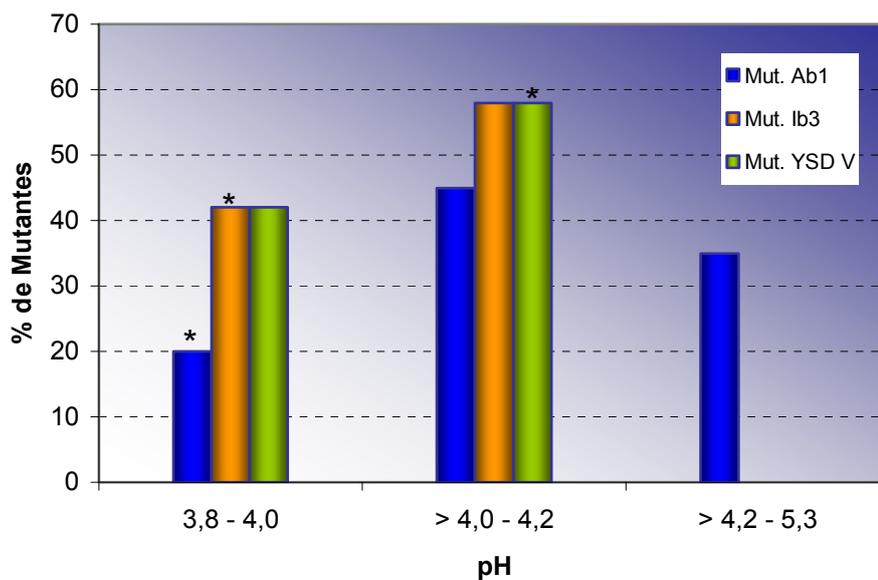


Fig. 16. Distribución porcentual de los mutantes espontáneos fagorresistentes, según el pH alcanzado por los cultivos en LDR (24 h, 42°C). (*) Rango al cual pertenece la correspondiente cepa sensible.

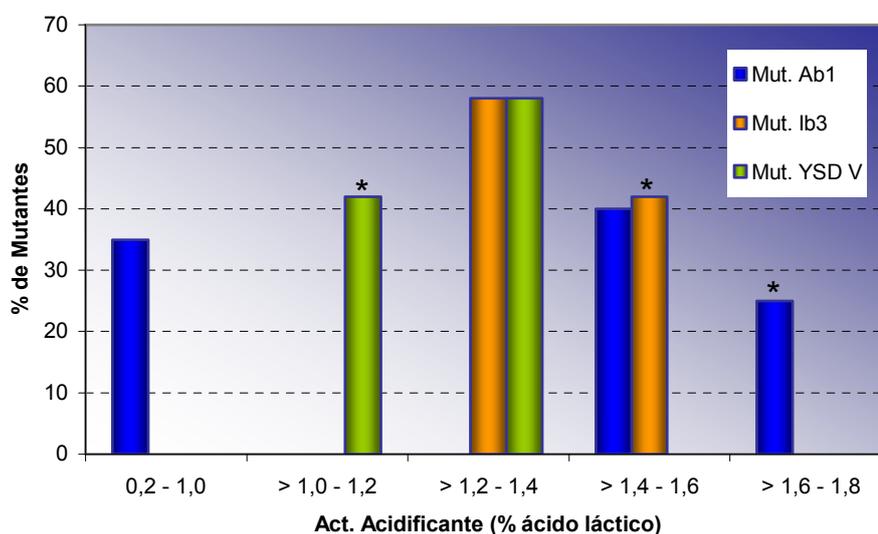


Fig. 17. Distribución porcentual de los mutantes espontáneos fagorresistentes, según su actividad acidificante (% de ácido láctico), valorada en cultivos en LDR (24 h, 42°C). (*) Rango al cual pertenece la correspondiente cepa sensible.

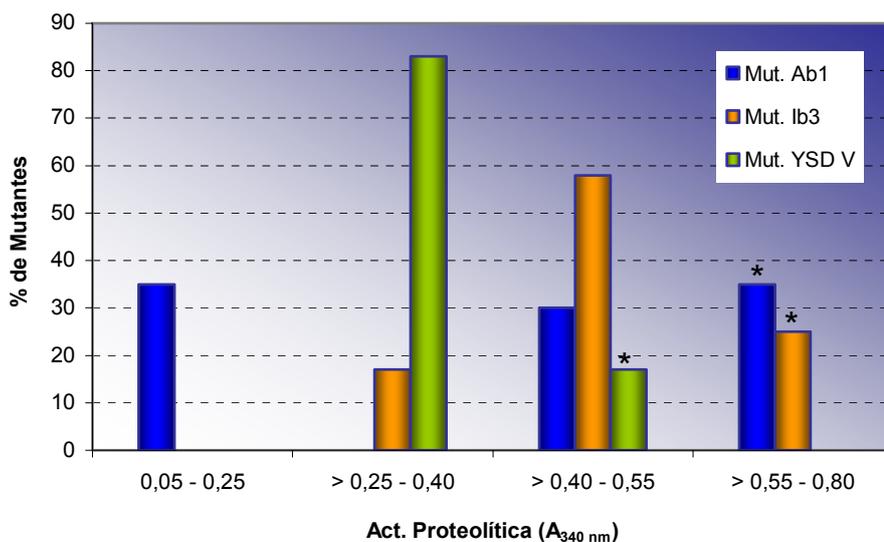


Fig. 18. Distribución porcentual de los mutantes espontáneos fagorresistentes, según su actividad proteolítica (OPA Test, A_{340}), valorada en cultivos en LDR (24 h, 42°C).

(*) Rango al cual pertenece la correspondiente cepa sensible.

IV.5.2. Cinéticas de acidificación en leche

Las variantes "rápidas" de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ presentaron cinéticas de acidificación similares a la exhibida por su cepa madre, alcanzando los mismos valores de pH que la misma. Las variantes "lentas" revelaron una velocidad de acidificación mucho menor (Fig. 19 A), observándose valores de pH superiores (24 h, 42°C), a los medidos para las variantes "rápidas" (menor producción de acidez). Los mutantes fagorresistentes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ desarrollaron acidez con una velocidad comparable, en general, a la de sus respectivas cepas madres (Fig. 19 B y 19 C).

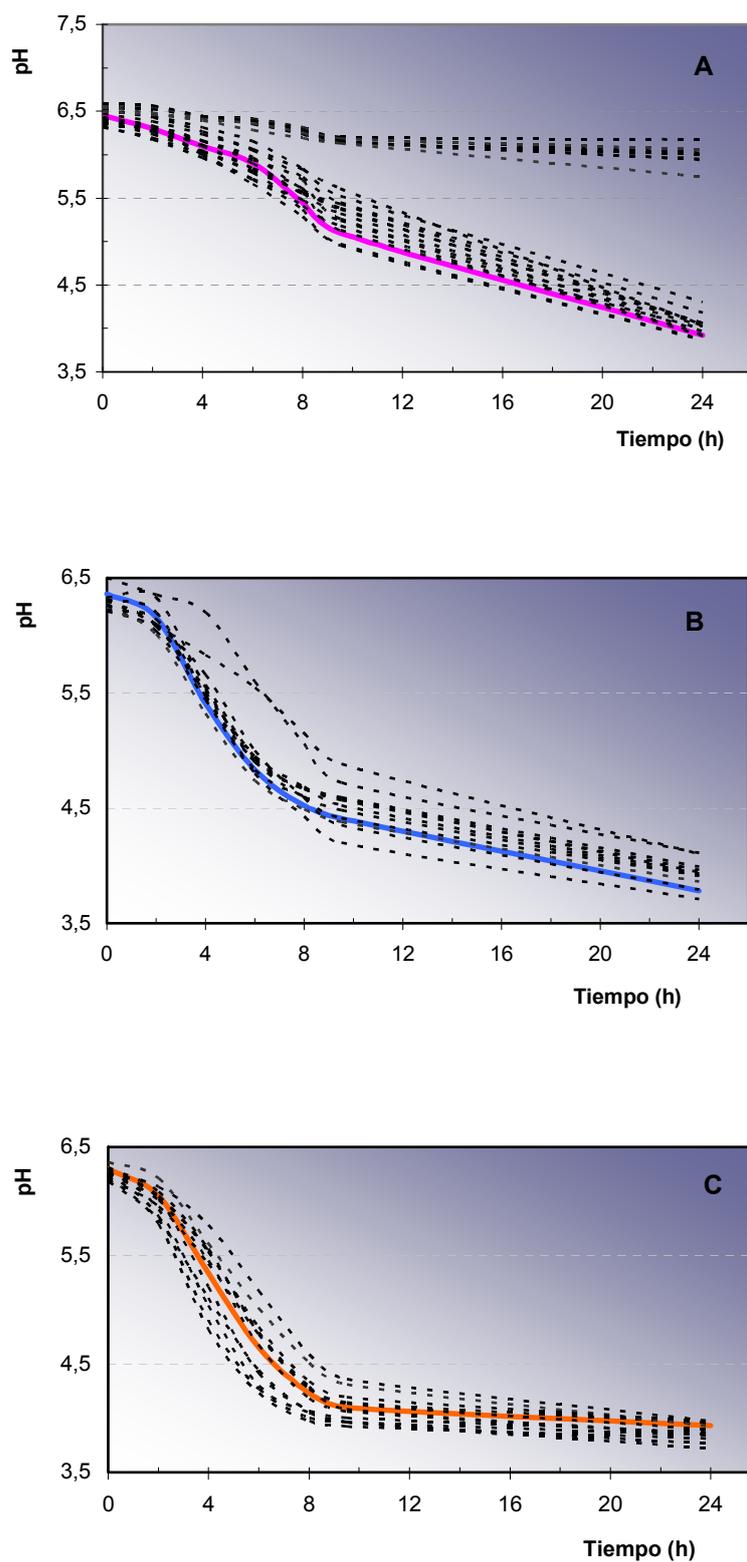


Fig. 19. Cinéticas de acidificación de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ (A) (—), *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* lb₃ (B) (—), *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (C) (—) y sus respectivos mutantes fagoresistentes (.....) a 42°C en LDR.

IV.5.3. Caracterización de las variantes "lentas" aisladas de *Lb. delbrueckii* Ab₁

Cuando las variantes "lentas" aisladas a partir de *Lb. delbrueckii* subsp *lactis* Ab₁ fueron desarrolladas en LDR con agregado de hidrolizado de caseína (LDR-HC) (0,25% p/v), fueron capaces de producir un descenso significativo del pH ($P < 0,05$), acidificando y coagulando la leche de manera similar a las cepas "rápidas". Algo similar ocurrió cuando las cepas fueron inoculadas en LDR adicionada de HC y glucosa (LDR-HC-Glu) (1% p/v), no existiendo diferencia significativa ($P > 0,05$) entre los resultados obtenidos con LDR-HC y LDR-HC-Glu. La adición de glucosa en la leche (LDR-Glu) tuvo cierta influencia en la capacidad acidificante de los mutantes ($P < 0,05$), aunque no tan marcada como los casos anteriores. Este ensayo demuestra que las variantes fagorresistentes "lentas" poseen sobre todo un déficit de actividad proteolítica (Prt⁻), la cual se ve compensada al aportarles una fuente nitrogenada simple (hidrolizado de caseína) (Tablas 10 y 11).

Tabla 10. Desarrollo de variantes fagorresistentes "lentas" aisladas a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁, en diferentes condiciones de cultivo (pH alcanzado luego de 24 h de incubación a 42°C).

Mutante	pH ^a			
	LDR ^b	LDR + HC ^c	LDR + Glu ^d	LDR + HC + Glu ^e
A ₁₇	5,66 ± 0,15	3,76 ± 0,09	5,56 ± 0,08	3,94 ± 0,11
A ₂₀	5,92 ± 0,11	3,76 ± 0,04	4,11 ± 0,13	3,87 ± 0,10
A ₂₅	5,91 ± 0,16	3,79 ± 0,04	4,93 ± 0,16	3,78 ± 0,04
A ₂₆	5,82 ± 0,13	3,77 ± 0,04	5,70 ± 0,28	3,81 ± 0,14
A ₂₇	5,86 ± 0,43	3,78 ± 0,06	5,35 ± 0,13	3,81 ± 0,06
A ₂₈	5,96 ± 0,13	3,80 ± 0,07	5,34 ± 0,10	3,79 ± 0,12
A ₂₉	5,89 ± 0,07	3,81 ± 0,08	5,52 ± 0,15	3,88 ± 0,11

^a: Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones ± desviación standard.

^b: Leche descremada reconstituida al 10%; ^c: LDR adicionada de hidrolizado de caseína (0,25%); ^d: LDR adicionada de glucosa (1%); ^e: LDR adicionada de hidrolizado de caseína (0,25%) y glucosa (1%).

Tabla 11. Análisis de varianza de una vía aplicado a los valores de pH obtenidos a partir del desarrollo de las variantes fagorresistentes "lentas" (n= 7), aisladas de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁, en distintas condiciones de cultivo (24 h, 42°C).

Multiple Range Tests for Col_1 by Col_2

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Col_2	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	7	3,78143	X
4	7	3,84	X
3	7	5,21571	X
1	7	5,86	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*2,07857	0,411113
1 - 3	*0,644286	0,411113
1 - 4	*2,02	0,411113
2 - 3	*-1,43429	0,411113
2 - 4	-0,0585714	0,411113
3 - 4	*1,37571	0,411113

* denotes a statistically significant difference.

- 1: pH resultante del desarrollo en LDR;
- 2: pH resultante del desarrollo en LDR-HC;
- 3: pH resultante del desarrollo en LDR-Glu;
- 4: pH resultante del desarrollo en LDR-HC-Glu.

IV.6. Caracterización biológica *in vitro*

Se estudiaron las características biológicas de las cepas de *Lb. delbrueckii* sensibles a fagos (Ab₁, Ib₃, YSD V) y de algunos de sus mutantes espontáneos fagorresistentes. Las variantes fagorresistentes seleccionadas fueron A₇ y A₁₇, aisladas a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁; I₃₉, obtenida de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃; y V₂, aislada a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V. Los mutantes fueron seleccionados teniendo en cuenta sus características tecnológicas, las cuales se asemejan a las de las cepas sensibles respectivas. La elección del mutante A₁₇ (variante "lenta") tuvo como objetivo evaluar las diferencias (si existieran) respecto a los mutantes "rápidos" (variante A₇).

IV.6.1. Tolerancia a jugo gástrico simulado

La mayoría de las cepas ensayadas sufrió pérdidas en su viabilidad celular cuando se incubaron en presencia de solución gástrica simulada (pH 2), que oscilaron entre 3 y 3,5 órdenes logarítmicos (Tabla 12). El mutante fagorresistente I₃₉ exhibió la menor resistencia a la solución ácida (disminución de 4,5 órdenes logarítmicos). El agregado de 20% de LDR a la solución gástrica influyó fuertemente los resultados, ya que impidió la disminución en los recuentos de células viables, demostrando el efecto protector ejercido por los componentes de la leche sobre la viabilidad celular bacteriana. Por otro lado, el desarrollo previo de los cultivos en LDR no mejoró la viabilidad celular de las cepas ensayadas. En este caso, las pérdidas en la viabilidad fueron similares ($P > 0,05$) a las registradas cuando los cultivos se inocularon directamente en la solución gástrica.

IV.6.2. Resistencia a bilis

Todas las cepas estudiadas presentaron escasa resistencia a la bilis, incluso a bajas concentraciones (Tabla 13). En presencia de 0,3% y 0,5% de bilis, las cepas desarrollaron entre 2,9 y 15,1% respecto al control, mientras que con 1% de bilis, el desarrollo observado fue inferior a 7,4% en todos los casos. En particular, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus mutantes fagorresistentes A₇ y A₁₇ fueron los que presentaron mayor resistencia (desarrollo entre 8,3 y 14,4%) en presencia de bilis, principalmente a 0,3 y 0,5% de la misma. Por otro lado, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y su mutante espontáneo I₃₉ también revelaron escasa tolerancia (entre 2,9 y 3,4%), a las tres concentraciones ensayadas (0,3, 0,5 y 1%). *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V presentó, asimismo, escasa resistencia (entre 3,4 y 4,2%) para dichas concentraciones. Por el contrario, su mutante fagorresistente V₂ reveló mayor resistencia (entre 6 y 15,1%).

Tabla 12. Tolerancia de cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes a jugo gástrico simulado (valores promedio de tres determinaciones \pm desviación standard).

Microorganismo/ Cepa	Tolerancia ^a en		
	Jugo gástrico simulado (JGS)	JGS adicionado de LDR (20%)	JGS adicionado de cultivos en LDR
<i>Lb. delbrueckii</i> Ab₁ ^b	3,30 \pm 0,14	0	3,13 \pm 0,05
subsp. <i>lactis</i> A ₇	3,41 \pm 0,09	0	3,41 \pm 0,10
A ₁₇	3,54 \pm 0,05	0	3,24 \pm 0,13
<i>Lb. delbrueckii</i> lb₃ ^b	3,08 \pm 0,12	0	2,90 \pm 0,07
subsp. <i>lactis</i> l ₃₉	4,52 \pm 0,11	0	4,61 \pm 0,13
<i>Lb. delbrueckii</i> YSD V ^b	3,22 \pm 0,06	0	3,32 \pm 0,14
subsp. <i>bulgaricus</i> V ₂	3,40 \pm 0,07	0	3,30 \pm 0,04

^a: Disminución en el recuento de células viables (órdenes logarítmicos UFC/ml) luego de una exposición durante 90 min a 37°C.

^b: Cepas sensibles a fagos.

IV.6.3. Resistencia a lisozima

Se observó un comportamiento heterogéneo de las cepas en presencia de lisozima (Tabla 14). Por un lado, el crecimiento de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y de sus mutantes fagorresistentes A₇ y A₁₇ no fue inhibido por la presencia de lisozima (90%-100% de desarrollo en 100 ppm de lisozima). Por el contrario, el desarrollo de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* lb₃ fue inhibido incluso a bajas concentraciones (29% de crecimiento respecto al control, en presencia de 25 ppm de lisozima). Notablemente, su mutante fagorresistente l₃₉ presentó mayor resistencia, observándose un crecimiento de 73 y 43% respecto del control (en presencia de 25 y 100 ppm de lisozima, respectivamente). Un comportamiento similar fue exhibido por *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (78 y 36% de desarrollo, en presencia de 25 y 100 ppm de lisozima),

mientras que su mutante fagorresistente V₂ presentó resistencia a concentraciones mayores (77% en presencia de 100 ppm de lisozima).

Tabla 13. Desarrollo de cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes en presencia de 0,3, 0,5 y 1,0% de bilis (valores promedio de tres determinaciones ± desviación standard).

Microorganismo/ Cepa		Desarrollo (%) ^a en presencia de bilis		
		0,3%	0,5%	1,0%
<i>Lb. delbrueckii</i>	Ab₁ ^b	11,7 ± 1,3	11,5 ± 1,4	7,4 ± 1,8
subsp. <i>lactis</i>	A ₇	13,4 ± 3,5	12,1 ± 3,3	6,3 ± 2,1
	A ₁₇	14,4 ± 1,7	8,3 ± 1,7	5,8 ± 1,1
<i>Lb. delbrueckii</i>	lb₃ ^b	3,4 ± 0,6	3,2 ± 0,3	3,1 ± 0,4
subsp. <i>lactis</i>	l ₃₉	3,4 ± 1,9	2,9 ± 0,5	2,9 ± 0,2
<i>Lb. delbrueckii</i>	YSD V ^b	4,2 ± 0,8	3,5 ± 0,4	3,4 ± 0,3
subsp. <i>bulgaricus</i>	V ₂	15,1 ± 2,1	14,2 ± 2,9	6,0 ± 1,7

^a: Respecto a un control (caldo MRS).

^b: Cepas sensibles a fagos.

IV.6.5. Uso de prebióticos

Los compuestos prebióticos fueron fermentados con distintas eficiencias, siendo la inulina el más utilizado por las cepas estudiadas (desarrollo entre 40% y 79,5%, respecto del control en MRS-glucosa) (Tabla 15). El mutante A₇ fue una excepción, ya que éste utilizó con mayor eficiencia la lactulosa (52,4%). La capacidad de fermentar la inulina por parte del mutante A₁₇ fue similar a la de su respectiva cepa madre, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ (62,7 y 61,5%, respectivamente), a diferencia del mutante A₇, cuya capacidad de fermentar este prebiótico fue marcadamente menor (29,4%). El mutante espontáneo l₃₉ fermentó la inulina con buena eficiencia, la cual fue mayor que la correspondiente a su cepa madre, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* lb₃ (55,1 y 40%,

respectivamente). Por otro lado, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V utilizó este prebiótico con gran eficiencia, en comparación con su mutante fagorresistente V₂ (79,5 y 52,4, respectivamente). El segundo prebiótico más utilizado fue la lactulosa, mientras que el xilitol y la rafinosa fueron fermentados de manera escasa (< 12%) por las cepas estudiadas y sus mutantes fagorresistentes.

Tabla 14. Desarrollo de cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes en presencia de 25, 50 y 100 ppm de lisozima (valores promedio de tres determinaciones \pm desviación standard).

Microorganismo/ Cepa	Desarrollo (%) ^a en presencia de lisozima		
	25 ppm	50 ppm	100 ppm
<i>Lb. delbrueckii</i> Ab₁ ^b	92 \pm 4	92 \pm 6	90 \pm 5
subsp. <i>lactis</i> A ₇	100 \pm 2	100 \pm 3	100 \pm 2
A ₁₇	100 \pm 5	100 \pm 1	100 \pm 3
<i>Lb. delbrueckii</i> Ib₃ ^b	29 \pm 7	17 \pm 2	6 \pm 2
subsp. <i>lactis</i> I ₃₉	73 \pm 2	48 \pm 3	43 \pm 5
<i>Lb. delbrueckii</i> YSD V ^b	78 \pm 5	66 \pm 4	36 \pm 2
subsp. <i>bulgaricus</i> V ₂	94 \pm 5	90 \pm 2	77 \pm 6

^a: Respecto a un control (caldo MRS).

^b: Cepas sensibles a fagos.

Tabla 15. Desarrollo de cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes en presencia de rafinosa, lactulosa, inulina y xilitol (2%, p/v) (valores promedio de tres determinaciones \pm desviación standard).

Microorganismo/ Cepa		Desarrollo (%) ^a en presencia de			
		Rafinosa	Lactulosa	Inulina	Xilitol
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Ab₁ ^b	7,7 \pm 0,3	40,4 \pm 5,3	61,5 \pm 1,3	3,1 \pm 2,1
	A ₇	7,5 \pm 1,2	52,4 \pm 2,9	29,4 \pm 3,6	3,1 \pm 0,5
	A ₁₇	11,9 \pm 0,8	33,3 \pm 4,1	62,7 \pm 5,5	2,5 \pm 0,6
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Ib₃ ^b	4,6 \pm 1,6	21,4 \pm 4,5	40,0 \pm 2,8	3,8 \pm 1,3
	I ₃₉	4,5 \pm 0,5	40,6 \pm 2,6	55,1 \pm 3,2	3,2 \pm 0,4
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	YSD V ^b	4,6 \pm 1,5	25,0 \pm 3,1	79,5 \pm 7,2	2,5 \pm 0,9
	V ₂	5,1 \pm 0,4	29,0 \pm 1,2	52,4 \pm 3,5	3,8 \pm 1,3

^a: Respecto a un control (caldo MRS-glucosa).

^b: Cepas sensibles a fagos.

IV.7. Caracterización probiótica *in vitro*

Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de las propiedades probióticas de las cepas de *Lb. delbrueckii* analizadas y de sus mutantes fagorresistentes se detallan en las Tablas 16 y 17.

IV.7.1. Capacidad de deconjugar sales biliares

Se observó un desarrollo heterogéneo de las cepas en presencia de las sales biliares ensayadas (taurocolato de sodio, TC y taurodeoxicolato de sodio, TDC). Sin embargo, ninguna de las cepas estudiadas fue capaz de deconjugar estas sales (Tabla 16).

Tabla 16. Características probióticas *in vitro* (deconjugación de sales biliares, actividad de β -galactosidasa e hidrofobicidad) de cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes.

Microorganismo/ Cepa	Deconjugación de sales biliares ^b		Actividad β -gal ^d (unid. Miller)	H (%) ^{c, d}
	TC	TDC		
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ ^a	inh	inh	41 ± 9	28 ± 5
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> A ₇	dn-	inh	51 ± 8	22 ± 3
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> A ₁₇	dn-	dn-	57 ± 3	25 ± 4
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ib ₃ ^a	dn-	dd-	508 ± 12	62 ± 3
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> I ₃₉	dn -	dd-	700 ± 25	63 ± 9
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V ^a	inh	inh	1370 ± 38	5 ± 2
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> V ₂	dn -	dn -	544 ± 18	8 ± 3

TC: taurocolato de sodio, TDC: taurodeoxicolato de sodio.

^a: Cepas sensibles a fagos.

^b: inh: inhibición completa; dd: desarrollo débil; dn: desarrollo normal; - :ausencia de deconjugación.

^c: Porcentaje de hidrofobicidad.

^d: Valores promedio de tres determinaciones ± desviación standard.

Lb. delbrueckii subsp. *lactis* Ab₁ fue inhibida totalmente por ambas sales. No obstante, uno de sus mutantes fagorresistentes (A₇) sólo fue inhibido por TDC, desarrollando normalmente en presencia de TC, mientras que el mutante A₁₇ presentó un crecimiento normal con ambas sales. *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y su mutante I₃₉ exhibieron débil desarrollo en presencia de TDC, aunque ambos desarrollaron muy bien en presencia de TC. Por otro lado, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V fue inhibido por ambas sales, si bien su mutante fagorresistente V₂ desarrolló normalmente en presencia de las mismas.

IV.7.2. Actividad de β -galactosidasa

Se evidenció actividad de β -galactosidasa en todas las cepas ensayadas, con valores que oscilaron entre 41 y 1370 unidades Miller (Tabla 16). El valor más elevado se encontró en *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (1370 unidades Miller), mientras que su mutante fagorresistente V₂ reveló una actividad considerablemente menor (544 unidades Miller). La actividad más baja fue exhibida por *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus mutantes (entre 41 y 57 unidades Miller). Por otro lado, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y su mutante I₃₉ evidenciaron elevados niveles de β -galactosidasa (508 y 700 unidades Miller, respectivamente).

IV.7.3. Hidrofobicidad

Los valores obtenidos para esta propiedad se mostraron dependientes de las tres "familias" de cepas analizadas (Tabla 16). Las cepas con mayor capacidad hidrofóbica fueron *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y su mutante fagorresistente I₃₉ (62 y 63%, respectivamente). *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus mutantes fagorresistentes A₇ y A₁₇ arrojaron valores que oscilaron entre 22 y 28%. Por otro lado, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y su mutante fagorresistente V₂ presentaron los valores más bajos (5 y 8%, respectivamente).

Durante el estudio de hidrofobicidad de las cepas, se realizaron observaciones microscópicas de las fases orgánica y acuosa, con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos por mediciones de densidad óptica (Fig. 20).

Para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃, se observó gran cantidad de bacilos en la fase orgánica (org) (Fig. 20 A), lo que confirmó su elevada hidrofobicidad. Por el contrario, en el caso de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, se obtuvo gran cantidad de bacterias en la fase acuosa (aq) (Fig. 20 B), indicando la mayor capacidad hidrofílica de esta cepa.

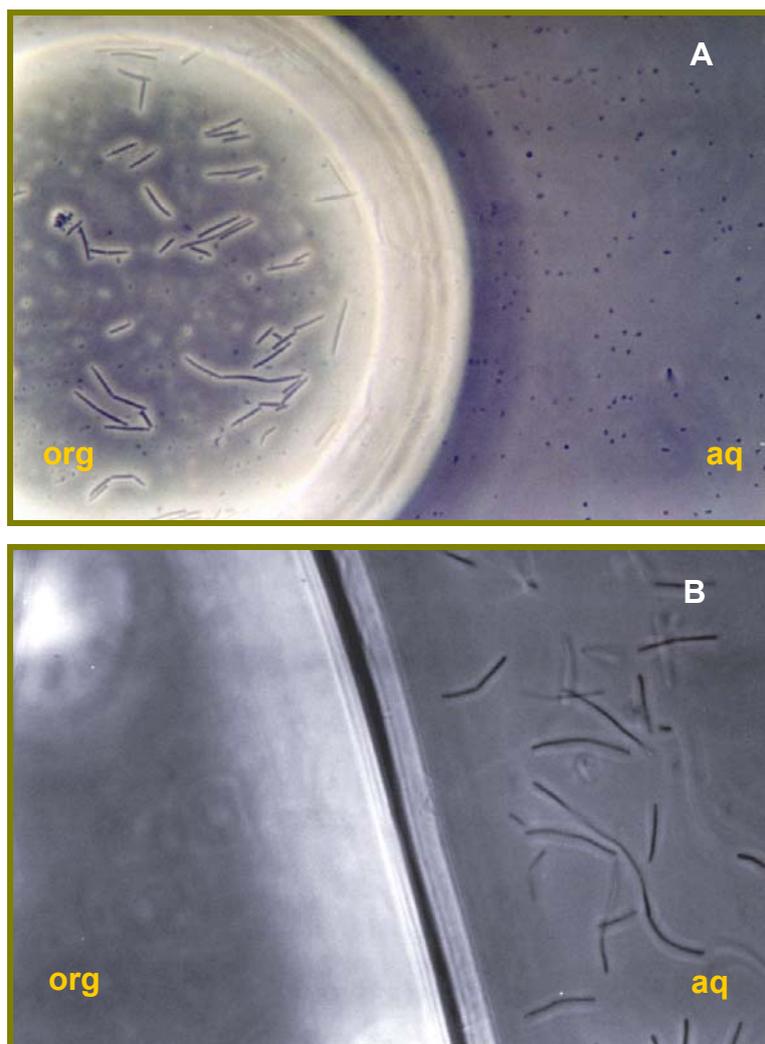


Fig. 20. Hidrofobicidad de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* lb₃ (A) y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (B). aq: fase acuosa, org: fase orgánica.

IV.7.4. Inhibición de bacterias patógenas

Todos los SLC de las cepas de *Lb. delbrueckii* estudiadas y sus respectivos mutantes espontáneos fagorresistentes demostraron tener algún efecto inhibitorio frente a las cuatro bacterias patógenas utilizadas (*Salmonella* sp. OMS-Ca, *E. coli* V517, *S. aureus* 76 y *L. monocytogenes* ATCC 15313) (Tabla 17).

Las bacterias patógenas Gram negativo ensayadas (*Salmonella* sp. OMS-Ca y *E. coli* V517) resultaron ser las más sensibles frente a los SLC de las cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes, dando halos de inhibición totales

(diámetros de los halos entre 0,47 y 1,06 cm) (Fig. 21 C y D; Fig. 22 C y D). Por el contrario, los SLC ensayados frente a los patógenos Gram positivo (*S. aureus* 76 y *L. monocytogenes* ATCC 15313) permitieron un cierto desarrollo de las bacterias patógenas, revelando halos de inhibición parciales (diámetros de los halos entre 0,98 y 1,63 cm) (Figs. 21 y 22, A y B).

Tabla 17. Inhibición de bacterias patógenas por parte de sobrenadantes libres de células (SLC) de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab₁ y sus respectivos mutantes fagorresistentes (valores promedio de tres determinaciones ± desviación standard).

SLC de		Inhibición ^b de			
		<i>Salmonella</i> sp. OMS-Ca	<i>E. coli</i> V517	<i>S. aureus</i> 76	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Ab ₁ ^a	1,01 ± 0,07	1,06 ± 0,04	1,56 ± 0,05 ^P	1,63 ± 0,08 ^P
	A ₇	0,83 ± 0,05	0,80 ± 0,01	1,25 ± 0,03 ^P	1,45 ± 0,02 ^P
	A ₁₇	0,84 ± 0,04	0,85 ± 0,03	1,31 ± 0,02 ^P	1,40 ± 0,01 ^P
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Ib ₃ ^a	0,89 ± 0,03	0,69 ± 0,03	1,12 ± 0,04 ^P	1,25 ± 0,06 ^P
	I ₃₉	0,47 ± 0,02	0,60 ± 0,01	0,98 ± 0,02 ^P	1,21 ± 0,03 ^P
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	YSD V ^a	0,96 ± 0,01	0,78 ± 0,02	1,36 ± 0,06 ^P	1,25 ± 0,08 ^P
	V ₂	0,98 ± 0,06	0,91 ± 0,02	1,39 ± 0,03 ^P	1,49 ± 0,03 ^P

^a: Cepas sensibles a fagos.

^b: [diámetro halo de inhibición (cm) – diámetro del hoyo (1 cm)].

^P: Halo de inhibición parcial.

Lb. delbrueckii subsp. *lactis* Ab₁ reveló halos de inhibición mayores ($P < 0,05$) a los de sus mutantes fagorresistentes (A₇ y A₁₇) en todos los casos. Algo similar ocurrió en el caso de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ respecto a su mutante fagorresistente I₃₉, pero las diferencias fueron significativas ($P < 0,05$) solamente para la inhibición de *Salmonella* sp. OMS-Ca. En cambio, los halos de inhibición para *Lb. delbrueckii* subsp.

bulgaricus YSD V fueron algo menores que para su mutante fagorresistente V₂, observándose diferencias significativas ($P < 0,05$) sólo cuando se considera *L. monocytogenes* ATCC 15313.

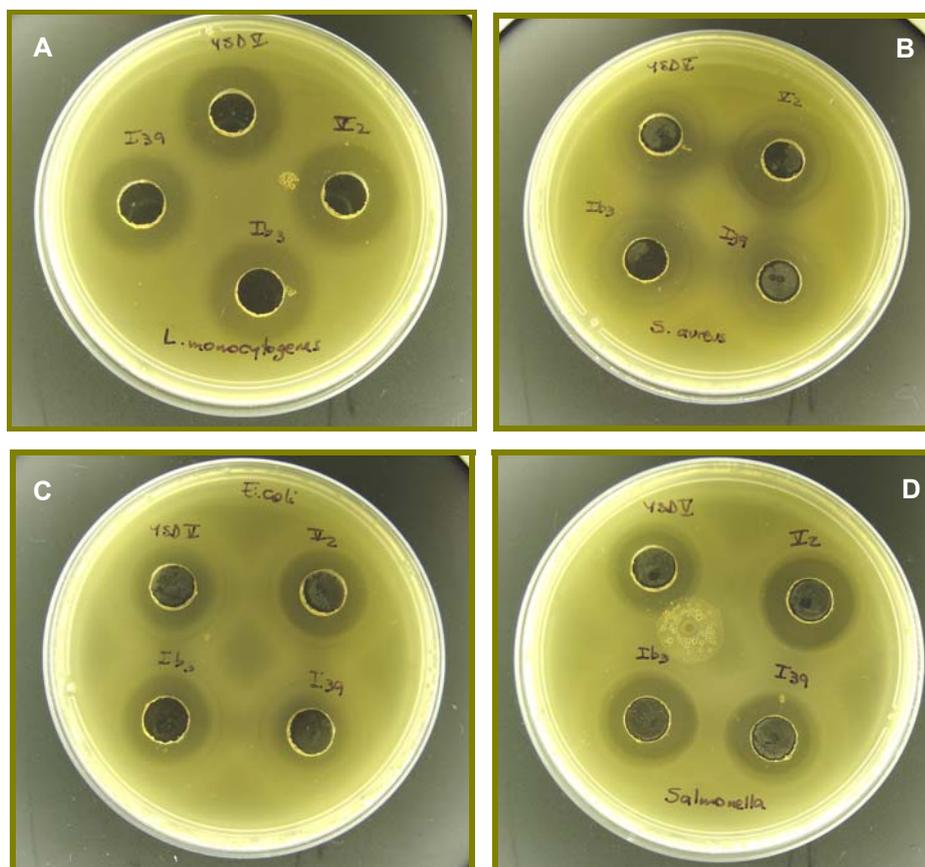


Fig. 21. Halos de inhibición obtenidos sobre *L. monocytogenes* ATCC 15313 (A), *S. aureus* 76 (B), *E. coli* V517 (C) y *Salmonella* sp. OMS-Ca (D), utilizando los SLC de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, su mutante fagorresistente V₂, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* I₃ y su mutante fagorresistente I₃₉, mediante la técnica de difusión en agar.

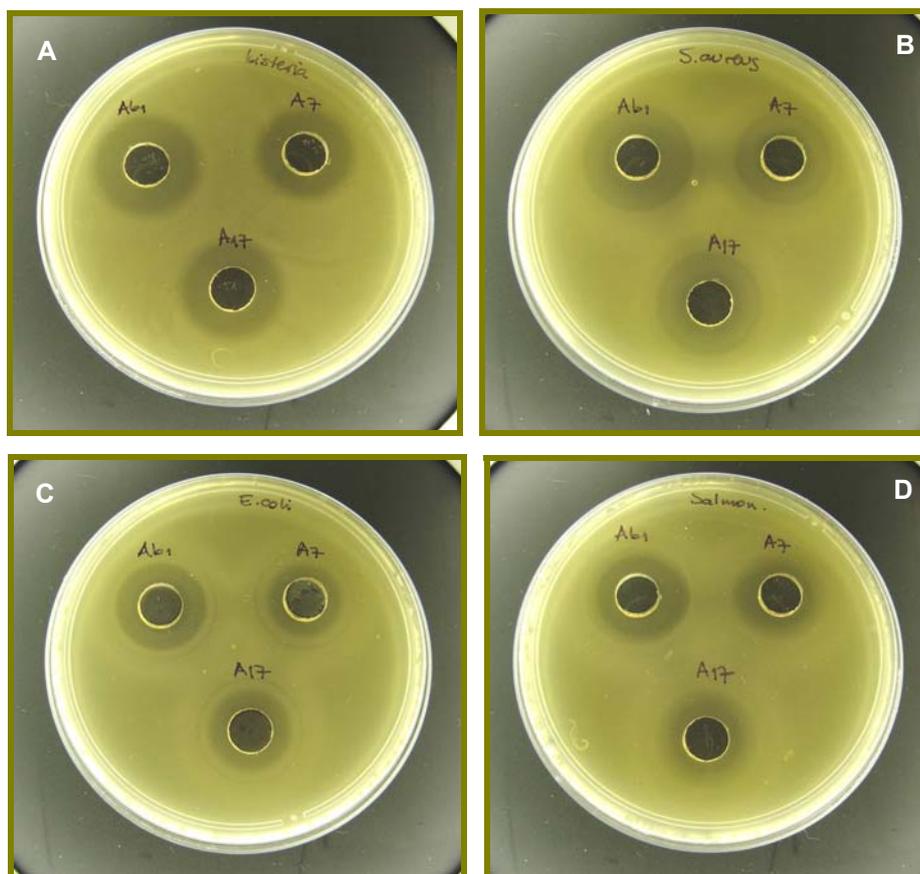


Fig. 22. Halos de inhibición obtenidos sobre *L. monocytogenes* ATCC 15313 (A), *S. aureus* 76 (B), *E. coli* V517 (C) y *Salmonella* sp. OMS-Ca (D), utilizando los SLC de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab₁, y sus mutantes fagorresistentes A₇ y A₁₇, mediante la técnica de difusión en agar.

IV.7.5. Naturaleza química de las sustancias inhibitoras de bacterias patógenas

Cuando se investigó la naturaleza química de las sustancias inhibitoras presentes en los SLC de las cepas de *Lb. delbrueckii* estudiadas, se observó que esta propiedad no disminuyó ($P > 0,05$) luego de someterlos a tratamiento térmico (121°C, 15 min) (Tablas 18, 19 y 20). Esto indicó que la/s sustancia/s inhibidora/s eran de naturaleza termoestable. Los tratamientos con pepsina y proteinasa K tampoco disminuyeron ($P > 0,05$) el poder inhibitorio de los SLC. Sin embargo, la neutralización con NaOH produjo la desaparición total ($P < 0,05$) del poder inhibitorio presente en

todos los SLC estudiados, indicando la naturaleza ácida de estos compuestos. La capacidad inhibitoria de los SLC (sin tratamiento) fue similar a la observada cuando se ensayó caldo MRS acidificado con ácido láctico (pH entre 3,8 y 4, correspondiente a los valores alcanzados por cada cepa durante su desarrollo). Sin embargo, cuando se utilizó caldo MRS acidificado con HCl se obtuvieron halos de inhibición parciales. Estos resultados estarían indicando que el poder inhibitorio de los SLC se debe, principalmente, a la acción específica del ácido láctico producido por las cepas durante su desarrollo. La Fig. 23 muestra la naturaleza inhibitoria de los SLC de algunas de las cepas de *Lb. delbrueckii* ensayadas, sobre las bacterias patógenas Gram negativo.

IV.7.6. Adhesión *in vitro* de *Lb. delbrueckii* a células eucarióticas en cultivo

Las tres cepas madres de *Lb. delbrueckii* fago-sensibles estudiadas y sus mutantes resistentes a fagos, fueron capaces de adherir a células intestinales Caco-2/TC-7 (Figs. 24 y 25). El nivel de adhesión de las cepas osciló entre 1,1% y 5,8%. Los porcentajes de adhesión más elevados se observaron para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus mutantes A₇ y A₁₇ (entre 3,8 y 5,8%). Los menores niveles de adhesión se observaron para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y su mutante fagorresistente I₃₉ (1,7 y 1,8%, respectivamente). Asimismo, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V presentó bajos niveles de adhesión a la línea de células intestinales Caco-2/TC-7 (1,1%). No obstante, su mutante espontáneo V₂ reveló niveles de adhesión notablemente superiores (3,5%).

En la Fig. 25 A y B se observa un fondo de células Caco-2/TC-7 confluentes ("césped"), y sobre estas, algunos bacilos adheridos a la superficie celular. Las bacterias se adhirieron individualmente o agrupadas. Estas agrupaciones bacilares pueden deberse a la presencia de alguna sustancia cohesiva, como exopolisacáridos. Es por esto que los valores de adhesión obtenidos mediante recuento en agar pueden no reflejar la realidad, ya que al momento de realizar el recuento, cada agrupación bacteriana se traduce en una "unidad formadora de colonia" (UFC).

Tabla 18. Halos de inhibición (en cm) de SLC de cultivos de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus mutantes fagorresistentes A₇ y A₁₇, sometidos a distintos tratamientos (valores promedio de tres determinaciones ± desviación standard).

Cepa / SLC y controles	Inhibición de ^a			
	<i>Salmonella</i> OMS-Ca	<i>E. coli</i> V517	<i>S. aureus</i> 76	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313
Ab₁				
SLC _{TC}	0,51 ± 0,05	1,05 ± 0,12	1,70 ± 0,15 ^P	1,08 ± 0,03 ^P
SLC _{NT}	0	0	0	0
SLC _{TT}	0,53 ± 0,02	1,1 ± 0,08	1,7 ± 0,08 ^P	1,0 ± 0,05 ^P
SLC _{PS}	0,60 ± 0,01	0,95 ± 0,02	1,63 ± 0,11 ^P	1,1 ± 0,02 ^P
SLC _{PK}	0,62 ± 0,12	1,03 ± 0,05	1,73 ± 0,12 ^P	1,1 ± 0,03 ^P
A₇				
SLC _{TC}	0,82 ± 0,04	0,82 ± 0,04	1,28 ± 0,05 ^P	0,57 ± 0,01 ^P
SLC _{NT}	0	0	0	0
SLC _{TT}	0,80 ± 0,05	0,93 ± 0,03	1,08 ± 0,08 ^P	0,60 ± 0,06 ^P
SLC _{PS}	0,70 ± 0,03	0,62 ± 0,01	1,27 ± 0,03 ^P	0,47 ± 0,11 ^P
SLC _{PK}	0,80 ± 0,13	0,80 ± 0,04	1,21 ± 0,03 ^P	0,55 ± 0,08 ^P
A₁₇				
SLC _{TC}	1,00 ± 0,05	0,91 ± 0,04	1,60 ± 0,08 ^P	0,71 ± 0,08 ^P
SLC _{NT}	0	0	0	0
SLC _{TT}	0,98 ± 0,15	0,91 ± 0,08	1,48 ± 0,05 ^P	0,80 ± 0,04 ^P
SLC _{PS}	0,77 ± 0,12	0,81 ± 0,12	1,70 ± 0,04 ^P	0,53 ± 0,03 ^P
SLC _{PK}	1,02 ± 0,10	0,83 ± 0,14	1,62 ± 0,13 ^P	0,78 ± 0,11 ^P
MRS	0	0	0	0
MRS-HCl	0,60 ± 0,01 ^P	0,65 ± 0,09 ^P	1,22 ± 0,15 ^P	0,57 ± 0,09 ^P
MRS-AL	0,88 ± 0,06	0,86 ± 0,05	1,58 ± 0,12 ^P	0,72 ± 0,13 ^P

TC: sin tratamiento; NT: neutralización con NaOH; TT: tratamiento térmico (121°C, 15 min); PS: tratamiento con pepsina; PK: tratamiento con proteinasa K, MRS-AL: caldo MRS acidificado con ácido láctico (pH 4), MRS-HCl: caldo MRS acidificado con ácido clorhídrico (pH 4).

^a: [diámetro halo de inhibición (cm) – diámetro del hoyo (1 cm)].

^P: Halo de inhibición parcial.

Tabla 19. Halos de inhibición (en cm) de SLC de cultivos de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y su mutante fagorresistente I₃₉, sometidos a distintos tratamientos (valores promedio de tres determinaciones ± desviación standard).

Cepa / SLC y controles	Inhibición de ^a			
	<i>Salmonella</i> OMS-Ca	<i>E. coli</i> V517	<i>S. aureus</i> 76	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313
Ib₃				
SLC _{TC}	0,65 ± 0,04	0,75 ± 0,05	1,40 ± 0,15 ^P	0,66 ± 0,03 ^P
SLC _{NT}	0	0	0	0
SLC _{TT}	0,63 ± 0,05	0,70 ± 0,12	1,52 ± 0,08 ^P	0,65 ± 0,07 ^P
SLC _{PS}	0,66 ± 0,03	0,60 ± 0,08	1,77 ± 0,11 ^P	0,61 ± 0,01 ^P
SLC _{PK}	0,62 ± 0,09	0,77 ± 0,14	1,35 ± 0,03 ^P	0,63 ± 0,15 ^P
I₃₉				
SLC _{TC}	0,67 ± 0,06	0,80 ± 0,06	1,44 ± 0,05 ^P	0,59 ± 0,03 ^P
SLC _{NT}	0	0	0	0
SLC _{TT}	0,73 ± 0,14	0,87 ± 0,05	1,27 ± 0,08 ^P	0,53 ± 0,09 ^P
SLC _{PS}	0,62 ± 0,07	0,55 ± 0,09	1,37 ± 0,06 ^P	0,58 ± 0,03 ^P
SLC _{PK}	0,77 ± 0,06	0,80 ± 0,01	1,40 ± 0,03 ^P	0,57 ± 0,02 ^P
MRS	0	0	0	0
MRS-HCl	0,48 ± 0,04 ^P	0,50 ± 0,06 ^P	1,15 ± 0,09 ^P	0,32 ± 0,02 ^P
MRS-AL	0,65 ± 0,10	0,75 ± 0,02	1,43 ± 0,13 ^P	0,58 ± 0,01 ^P

TC: sin tratamiento; NT: neutralización con NaOH; TT: tratamiento térmico (121°C, 15 min); PS: tratamiento con pepsina; PK: tratamiento con proteinasa K, MRS-AL: caldo MRS acidificado con ácido láctico (pH 4), MRS-HCl: caldo MRS acidificado con ácido clorhídrico (pH 4).

^a: [diámetro halo de inhibición (cm) – diámetro del hoyo (1 cm)].

^P: Halo de inhibición parcial.

Tabla 20. Halos de inhibición (en cm) de SLC de cultivos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y su mutante fagorresistente V₂, sometidos a distintos tratamientos (valores promedio de tres determinaciones ± desviación standard).

Cepa / SLC y controles	Inhibición de ^a			
	<i>Salmonella</i> OMS-Ca	<i>E. coli</i> V517	<i>S. aureus</i> 76	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313
YSD V				
SLC _{TC}	0,73 ± 0,05	0,82 ± 0,07	0,51 ± 0,01 ^P	0,46 ± 0,05 ^P
SLC _{NT}	0	0	0	0
SLC _{TT}	0,73 ± 0,03	0,80 ± 0,04	0,42 ± 0,02 ^P	0,43 ± 0,03 ^P
SLC _{PS}	0,72 ± 0,10	0,92 ± 0,01	0,58 ± 0,08 ^P	0,45 ± 0,06 ^P
SLC _{PK}	0,80 ± 0,02	0,85 ± 0,03	0,50 ± 0,03 ^P	0,43 ± 0,06 ^P
V₂				
SLC _{TC}	0,65 ± 0,05	0,73 ± 0,05	0,51 ± 0,01 ^P	0,52 ± 0,03 ^P
SLC _{NT}	0	0	0	0
SLC _{TT}	0,67 ± 0,09	0,90 ± 0,13	0,63 ± 0,04 ^P	0,51 ± 0,02 ^P
SLC _{PS}	0,67 ± 0,03	0,67 ± 0,09	0,42 ± 0,02 ^P	0,53 ± 0,03 ^P
SLC _{PK}	0,53 ± 0,05	0,67 ± 0,12	0,50 ± 0,01 ^P	0,60 ± 0,01 ^P
MRS	0	0	0	0
MRS-HCl	0,45 ± 0,12 ^P	0,48 ± 0,05 ^P	0,39 ± 0,02 ^P	0,33 ± 0,01 ^P
MRS-AL	0,69 ± 0,02	0,75 ± 0,01	0,60 ± 0,05 ^P	0,55 ± 0,06 ^P

TC: sin tratamiento; NT: neutralización con NaOH; TT: tratamiento térmico (121°C, 15 min); PS: tratamiento con pepsina; PK: tratamiento con proteinasa K, MRS-AL: caldo MRS acidificado con ácido láctico (pH 4), MRS-HCl: caldo MRS acidificado con ácido clorhídrico (pH 4).

^a: [diámetro halo de inhibición (cm) – diámetro del hoyo (1 cm)].

^P: halo de inhibición parcial.

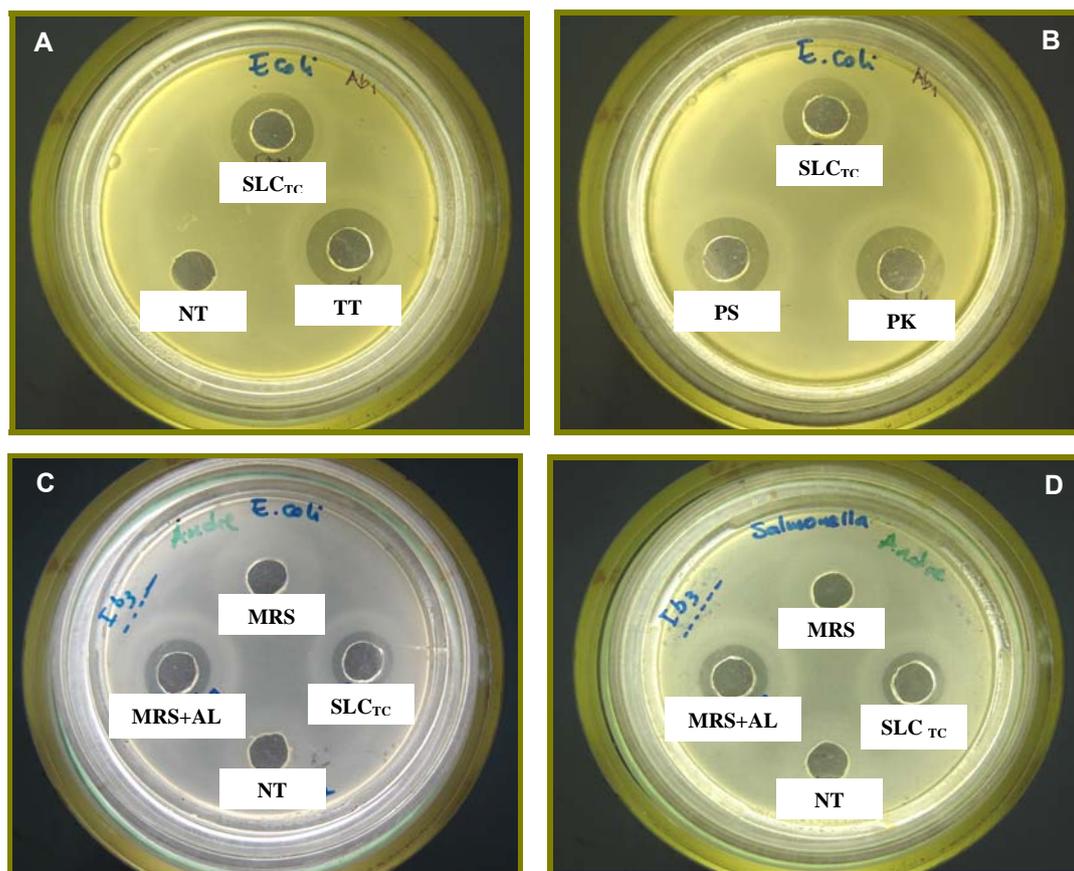


Fig. 23. Halos de inhibición obtenidos utilizando SLC de *Lb. delbrueckii* Ab₁ (A y B) e Ib₃ (C y D), sobre *E. coli* V517 (A, B y C) y *Salmonella* sp OMS-Ca (D). SLC_{Tc}: SLC sin tratamiento; TT: SLC calentado (121°C, 15 min), NT: SLC neutralizado (pH 7); PS: SLC tratado con pepsina; PK: SLC tratado con proteinasa K; MRS: medio de cultivo (pH 6,8); MRS+AL: medio de cultivo acidificado con ácido láctico (pH 4).

IV.7.7. Inhibición de la adhesión e invasión de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis por sobrenadantes de cepas de *Lb. delbrueckii*

En general, el pretratamiento realizado a *S. enterica* serovar Enteritidis con los SLC (1 h, 37°C) condujo a una disminución importante en la adhesión de este patógeno a las células eucarióticas, y también redujo su capacidad de invasión (Fig. 26). Se observó un incremento en el recuento extracelular de *S. enterica* serovar Enteritidis cuando este patógeno fue pretratado con los SLC, en comparación con el recuento de células de la bacteria patógena en el ensayo control (pretratamiento con PBS). La asociación del patógeno disminuyó levemente cuando se lo preincubó

con MRS (pH 4,5), mientras que la proporción de bacterias patógenas extracelulares aumentó, en comparación con el ensayo control (en PBS).

El pretratamiento del patógeno con los SLC de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus mutantes espontáneos A₇ y A₁₇ condujo a una marcada disminución en la adhesión e invasión de *S. enterica* serovar Enteritidis a las células Caco-2/TC-7. El efecto fue similar para la cepa madre fago-sensible Ab₁ y su mutante fagorresistente A₁₇, y más acentuado para el mutante A₇. Asimismo, el pretratamiento del patógeno con SLC de cultivos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y de su variante fagorresistente V₂, derivó en una notable disminución de la capacidad de adhesión e invasión de este patógeno. Algo similar ocurrió cuando se puso en contacto a *S. enterica* serovar Enteritidis con SLC de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃. Sin embargo, el pretratamiento del patógeno con SLC de su mutante fagorresistente I₃₉, reveló menor efectividad en la reducción de la asociación e invasión del patógeno, demostrando menor poder antimicrobiano que su correspondiente cepa madre.

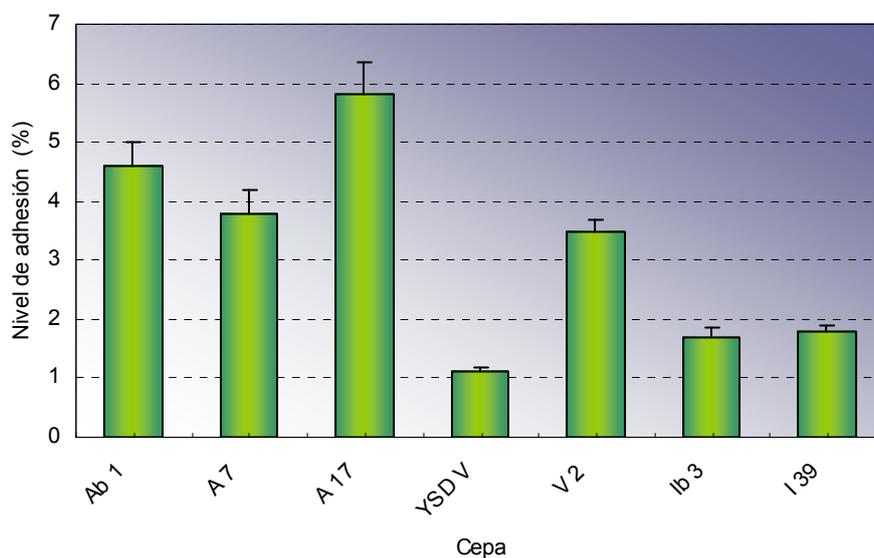


Fig. 24. Adhesión de cepas de *Lb. delbrueckii* sensibles a fagos (Ab₁, YSD V e Ib₃) y sus respectivos mutantes fagorresistentes (A₇, A₁₇, V₂ e I₃₉) a células intestinales Caco-2/TC-7. Las barras representan el promedio \pm desviación standard de tres experiencias independientes.

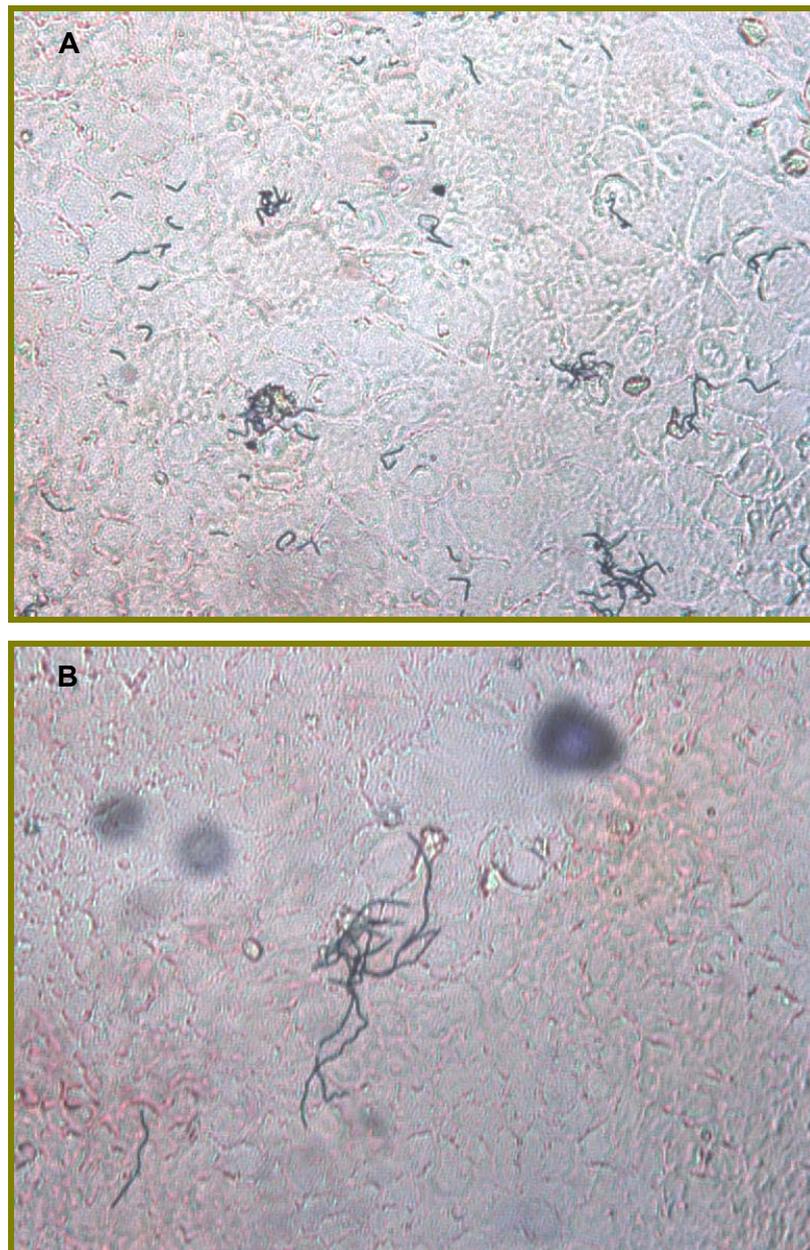


Fig. 25. Adhesión de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ (A) y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (B) a células Caco-2/TC-7. Fotografías obtenidas por examen al microscopio óptico (400 x), de las células Caco-2/TC-7 cultivadas sobre portaobjetos redondos, fijadas con formol y coloreadas con Gram, luego del ensayo de adhesión.

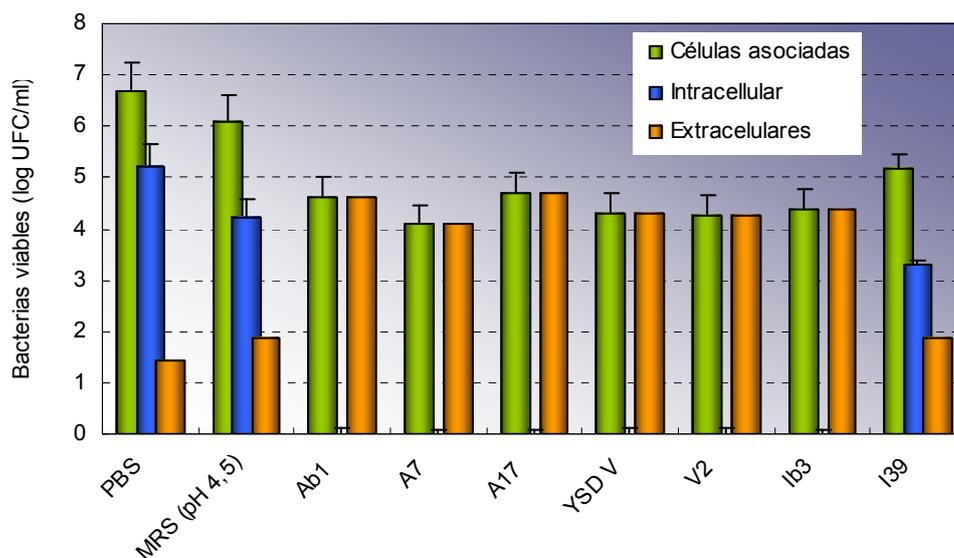


Fig. 26. Efecto del pretratamiento de *S. enterica* serovar Enteritidis con SLC de cepas de *Lb. delbrueckii* sensibles a fagos (Ab₁, YSD V e Ib₃) y sus respectivos mutantes fagorresistentes (A₇, A₁₇, V₂ e I₃₉) en relación a la capacidad de *S. enterica* serovar Enteritidis para adherir e invadir células Caco-2/TC-7. Los efectos se exhiben en comparación con aquellos observados en PBS (control) y MRS (pH 4,5). Las barras representan el promedio \pm desviación standard de tres experiencias independientes.

IV.8. Estudio *in vivo* de la capacidad inmunoestimulante de cepas de *Lb. delbrueckii* sensibles a fagos, y sus mutantes espontáneos fagorresistentes

IV.8.1. Ensayo de traslocación

El ensayo de traslocación se realizó en el hígado de los animales control y en los ratones que recibieron las suspensiones de las tres cepas madres (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃) y sus mutantes fagorresistentes (V₂, A₇ y A₁₇, e I₃₉, respectivamente), en dosis de 10⁸ UFC/día/animal durante 2, 5 o 7 días consecutivos. No se detectaron bacterias en el hígado de los ratones del grupo control ni del grupo tratado para ninguna de las dosis ensayadas. Este hecho demostró que la cantidad de bacterias administradas en forma

oral fue adecuada y segura, y que no induciría ningún desequilibrio de la microflora intestinal que pudiera conducir a su traslocación a otros órganos.

IV.8.2. Estudio histológico del intestino

El estudio histológico del intestino delgado (mediante coloración con hematoxilina-eosina) no reveló diferencias en la estructura morfológica entre el grupo de ratones control y el grupo que recibió las suspensiones de *Lb. delbrueckii*. Se observaron algunos infiltrados linfocitarios con ausencia de edema o atrofia de la mucosa. La altura y la profundidad de las vellosidades del intestino de los animales tratados fueron similares a la de los ratones del grupo control. No se observaron cambios morfológicos significativos en la arquitectura general del intestino delgado del grupo de ratones tratados respecto al grupo control de ratones.

IV.8.3. Determinación del número de células IgA⁺ presentes en el intestino delgado por inmunofluorescencia

Todas las cepas fago-sensibles de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes estudiados, fueron capaces de activar la respuesta inmune mediada por células IgA⁺ en la mucosa del intestino delgado, pero de manera distinta (Fig. 27). La administración oral de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y su mutante fago resistente V₂ condujo a un incremento significativo en el número de células IgA⁺ en la lámina propia del intestino delgado para todos los períodos de alimentación ensayados, aunque no se observó diferencia en el perfil de células IgA⁺ obtenido entre estas cepas. La administración oral de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y su mutante fagorresistente Ib₉ también indujo a un aumento importante en el número de células IgA⁺ para todos los períodos de alimentación ensayados, pero el perfil observado fue distinto que en el caso de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V. Para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y su mutante espontáneo, la máxima proliferación de células IgA⁺ se observó al día 7, mientras que para *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y su mutante se observó al día 5. Por último, la administración oral de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ provocó un incremento significativo en el número de células IgA⁺ sólo al

quinto día de alimentación, mientras que para sus mutantes fagorresistentes A₇ y A₁₇ se verificó un aumento importante de células IgA⁺ para todos los períodos de alimentación ensayados. Ambos mutantes fagorresistentes (A₇ y A₁₇) revelaron mejor capacidad para inducir la proliferación de células IgA⁺ que su cepa madre, aunque no se observó diferencia significativa entre ellos.

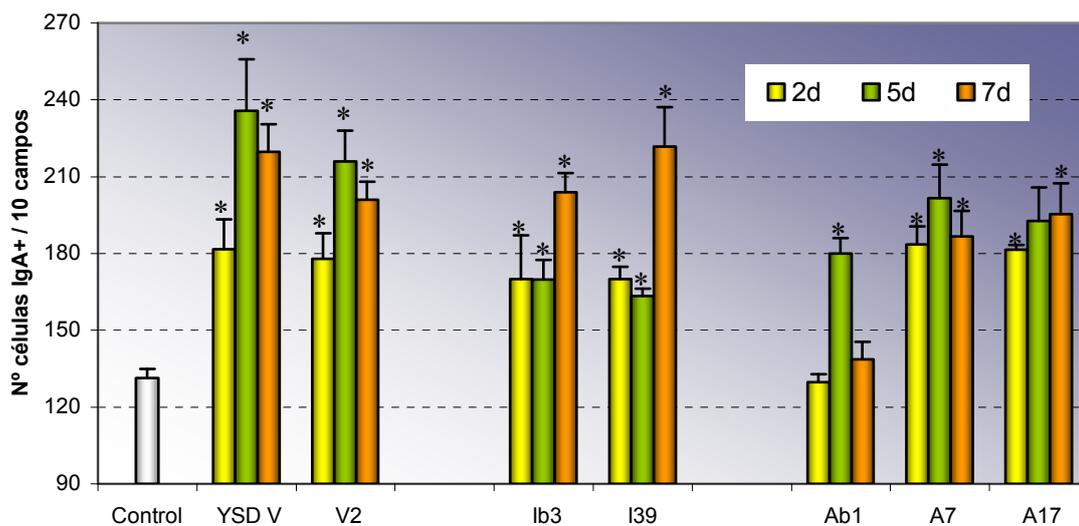


Fig. 27. Efecto de la administración oral de cultivos de *Lb. delbrueckii* sensibles a fagos (Ab₁, YSD V e lb₃) y de sus mutantes espontáneos fagorresistentes (A₇, A₁₇, V₂ e l₃₉) durante 2, 5 o 7 días consecutivos (10⁸ UFC/día/ratón), sobre el número de células productoras de IgA en la lámina propia del intestino delgado de ratones. (*) Diferencia significativa respecto al control ($P < 0,05$). Las barras con el mismo superíndice no difieren significativamente ($P > 0,05$).

IV.9. Derivados adaptados a bilis

Considerando la escasa tolerancia de las cepas de *Lb. delbrueckii* estudiadas a la bilis (Sección IV.6.2), se planteó el propósito de obtener derivados con resistencia incrementada a bilis.

IV.9.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

La CIM osciló entre 0,35 y 0,40% de bilis para todas las cepas de *Lb. delbrueckii* ensayadas (Tabla 21). En particular, la CIM para la cepa fago-sensible *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y su mutante fagorresistente A₇ fue ligeramente menor (0,35% de bilis) que para su mutante A₁₇ (0,40%). La variante espontánea V₂ presentó un valor de CIM algo mayor (0,40% de bilis) que su cepa madre *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (0,35%). *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y su mutante fagorresistente I₃₉ presentaron idéntico valor de CIM (0,35%).

Tabla 21. Desarrollo (24 h, 37°C) de cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes en medio líquido adicionado de bilis.

Microorganismo/ Cepa	Desarrollo (%) ^a en presencia de bilis (%)									
	0,01	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab ₁ ^b	99	98	92	53	15	7	3	0	-	
A ₇	100	99	98	65	32	17	5	0	-	
A ₁₇	100	97	95	83	55	23	18	6	0	
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ib ₃ ^b	100	90	77	49	34	18	6	0	-	
I ₃₉	100	94	47	14	9	8	6	0	-	
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V ^b	98	97	69	23	22	17	2	0	-	
V ₂	100	97	96	79	76	58	27	12	0	

^a: Respecto a un cultivo control (caldo MRS sin bilis).

^b: Cepas sensible a fagos.

IV.9.2. Obtención de derivados adaptados a bilis

Fue posible obtener derivados adaptados a 0,3, 0,6 y 0,9 % de bilis a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ (Ab₁^{0,3}, Ab₁^{0,6} y Ab₁^{0,9}) y sus mutantes fagorresistentes A₇ (A₇^{0,3}, A₇^{0,6} y A₇^{0,9}) y A₁₇ (A₁₇^{0,3}, A₁₇^{0,6} y A₁₇^{0,9}), así como para *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (YSD V^{0,3}, YSD V^{0,6} y YSD V^{0,9}) y su mutante V₂ (V₂^{0,3}, V₂^{0,6} y V₂^{0,9}), para las

mismas concentraciones de bilis. Sin embargo, no fue posible obtener derivados adaptados a bilis a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y su mutante espontáneo I₃₉.

IV.9.3. Estabilidad de los derivados adaptados a bilis

Cuando se consideró la metodología (a) descrita en la Sección IV.9.3 (Materiales y Métodos), se obtuvieron los siguientes resultados. Los derivados adaptados a bilis obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus mutantes fagorresistentes A₇ y A₁₇ fueron estables, presentando un desarrollo adecuado a lo largo de los 6 repiques realizados en caldo MRS y una muy buena tolerancia posterior a la bilis en medio agarizado (Fig. 28). Por el contrario, los derivados obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y su mutante fagorresistente V₂ revelaron pérdida de estabilidad respecto a la resistencia a bilis, exhibiendo escasa tolerancia luego de seis repiques en caldo MRS y exposición a la bilis en medio agarizado (Fig. 29).

Cuando se analizaron los resultados obtenidos utilizando la metodología (b) descrita en la Sección IV.9.3 (Materiales y Métodos), se observó que los derivados aislados a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus mutantes fagorresistentes A₇ y A₁₇ fueron estables, reflejándose en la DO₅₆₀ medida (Fig. 30) y en los recuentos celulares en medio agarizado (Fig. 32). La escasa estabilidad de los derivados aislados de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y su mutante fagorresistente V₂ coincidieron con valores de DO₅₆₀ y de recuentos en medio agarizado muy bajos (Figs. 31 y 33, respectivamente).

Con respecto a la morfología de los derivados estables obtenidos, se pudo apreciar que, en general, el tamaño celular disminuyó con la adaptación a bilis. La Fig. 34 muestra la morfología de *Lb. delbrueckii* Ab₁ (sin adaptar) y de su derivado Ab₁^{0,9}, luego de seis repiques sucesivos en caldo MRS. Esta observación demostró que la morfología del derivado es estable, aún después de seis repiques sucesivos en ausencia de bilis.

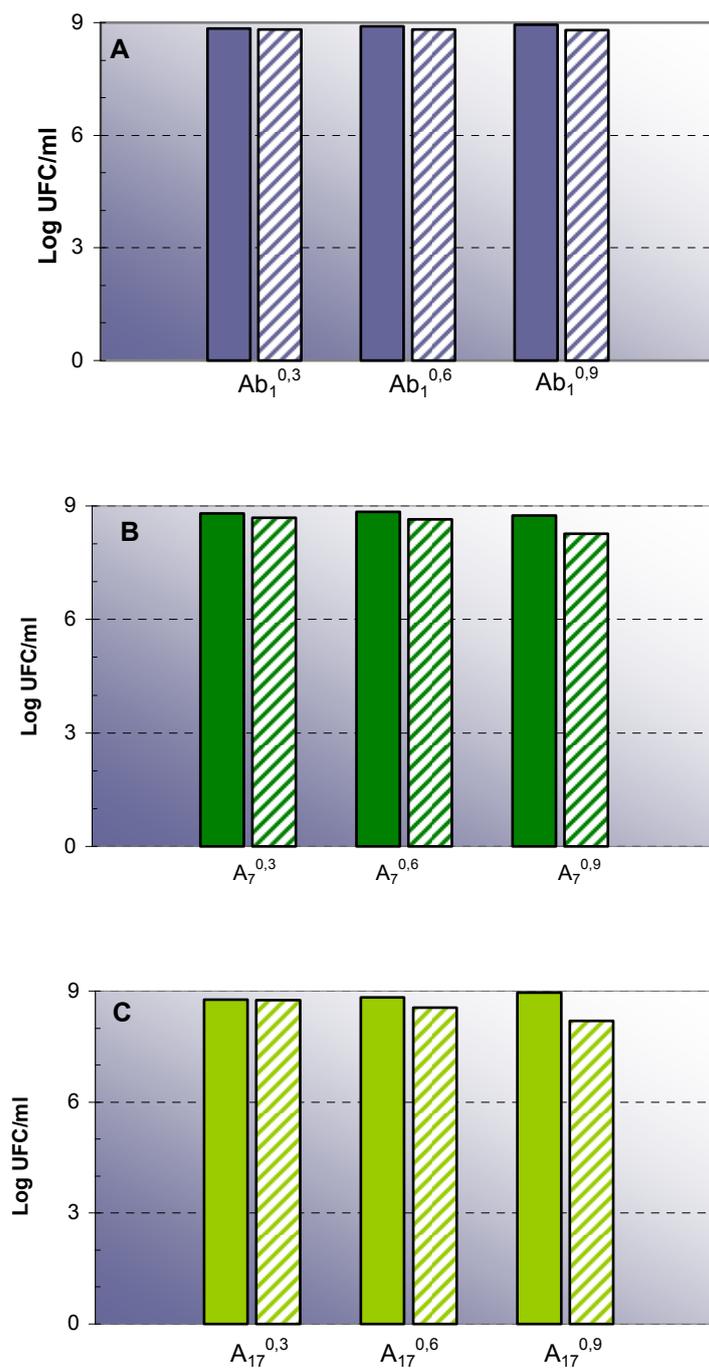


Fig. 28. Estabilidad (metodología **a**) de derivados adaptados a bilis de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* *Ab*₁ (A) y sus mutantes *A*₇ (B) y *A*₁₇ (C). Recuentos en agar MRS (48h, 37°C) adicionado (▨) o no (■) de bilis (0,3%, 0,6% ó 0,9%), luego de seis repiques en caldo MRS.

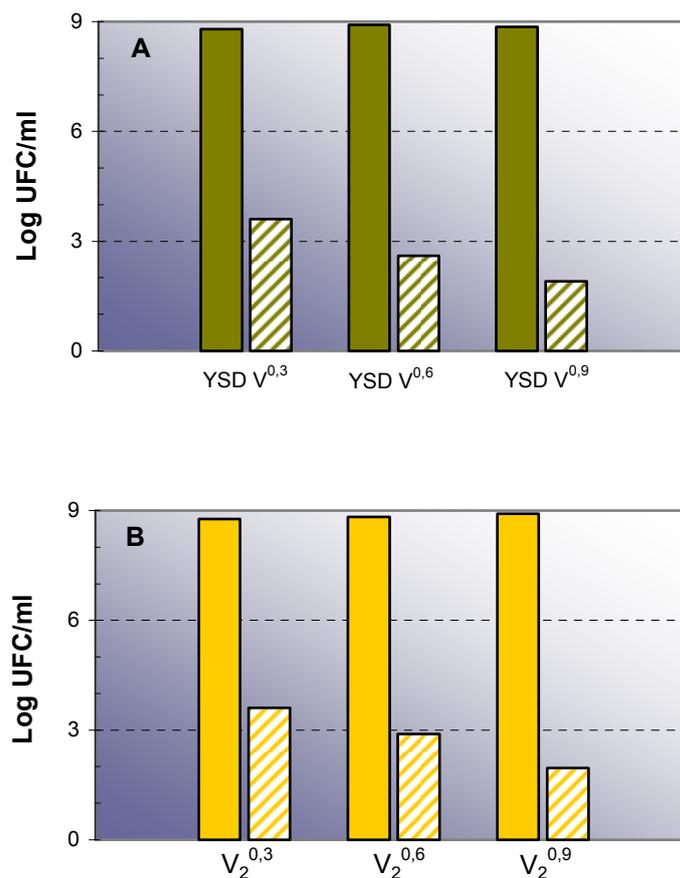


Fig. 29. Estabilidad (metodología **a**) de derivados adaptados a bilis de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (A) y su mutante V₂ (B). Recuentos en agar MRS (48h, 37°C) adicionado (▨) o no (■) de bilis (0,3%, 0,6% ó 0,9%), luego de seis repiques en caldo MRS.

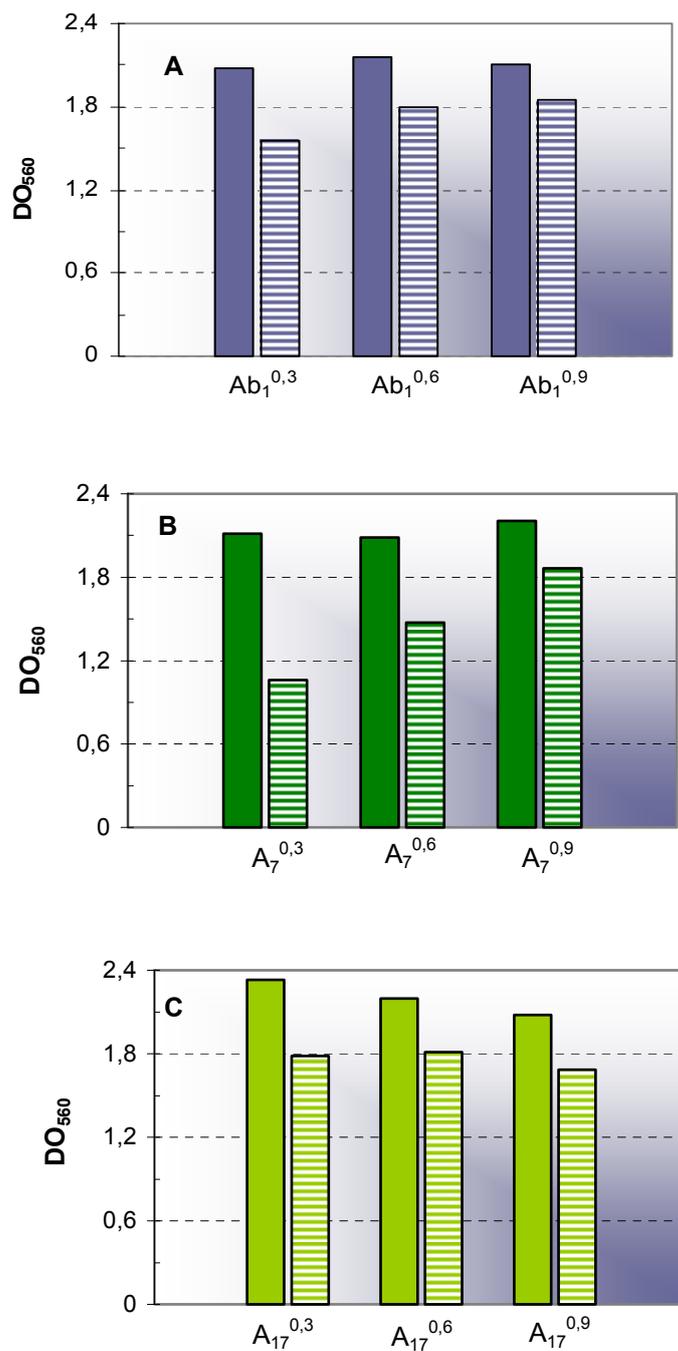


Fig. 30. Estabilidad (metodología **b**) de derivados adaptados a bilis de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* *Ab*₁ (A) y sus mutantes *A*₇ (B) y *A*₁₇ (C). Desarrollo (DO₅₆₀) de los cultivos en caldo MRS adicionado (▨) o no (■) de bilis (0,3%, 0,6% ó 0,9%), luego de seis repiques en caldo MRS.

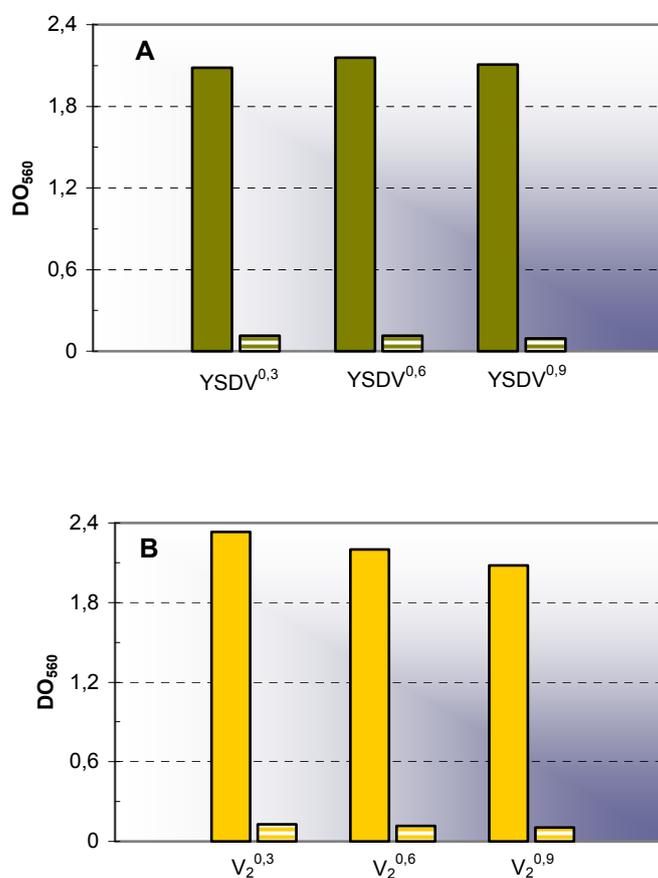


Fig. 31. Estabilidad (metodología **b**) de derivados adaptados a bilis de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (A) y su mutante V₂ (B). Desarrollo (DO₅₆₀) de los cultivos en caldo MRS adicionado (▨) o no (■) de bilis (0,3%, 0,6% ó 0,9%), luego de seis repiques en caldo MRS.

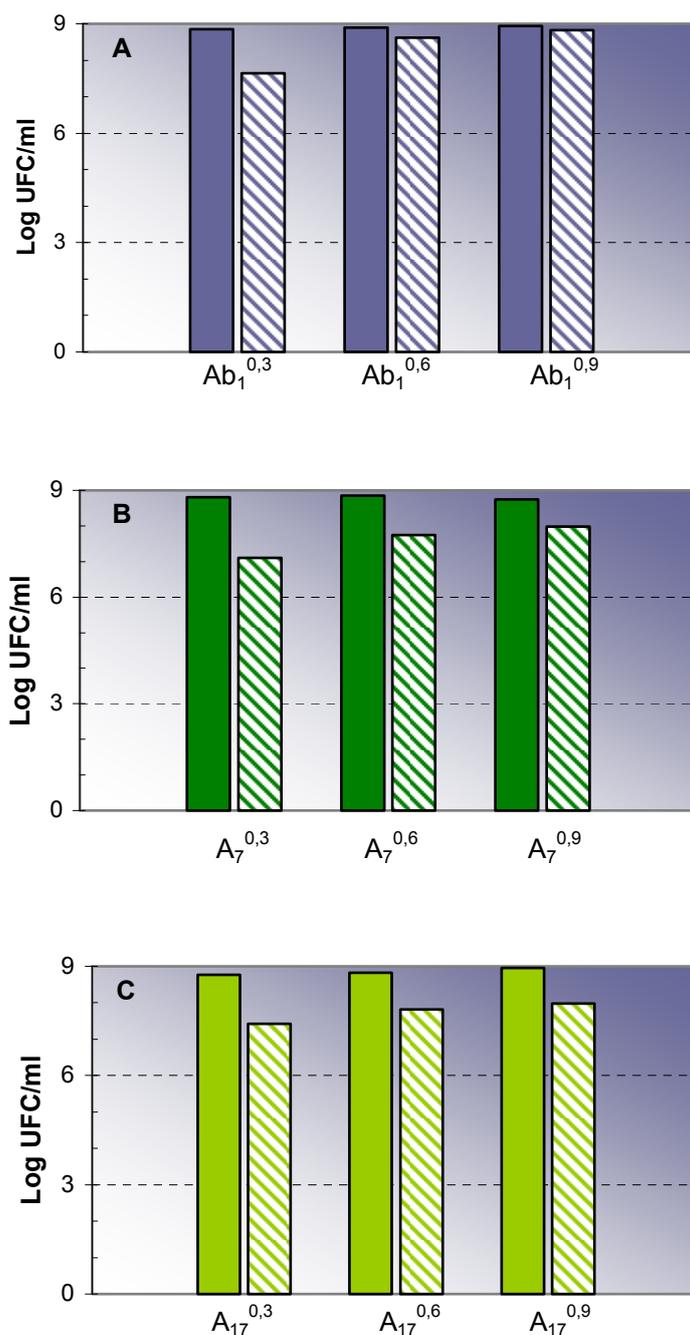


Fig. 32. Estabilidad (metodología **b**) de derivados adaptados a bilis de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ (A) y sus mutantes A₇ (A) y A₁₇ (C). Recuentos en agar MRS de los cultivos en caldo MRS adicionado (▨) o no (■) de bilis (0,3%, 0,6% ó 0,9%), luego de seis repiques en caldo MRS.

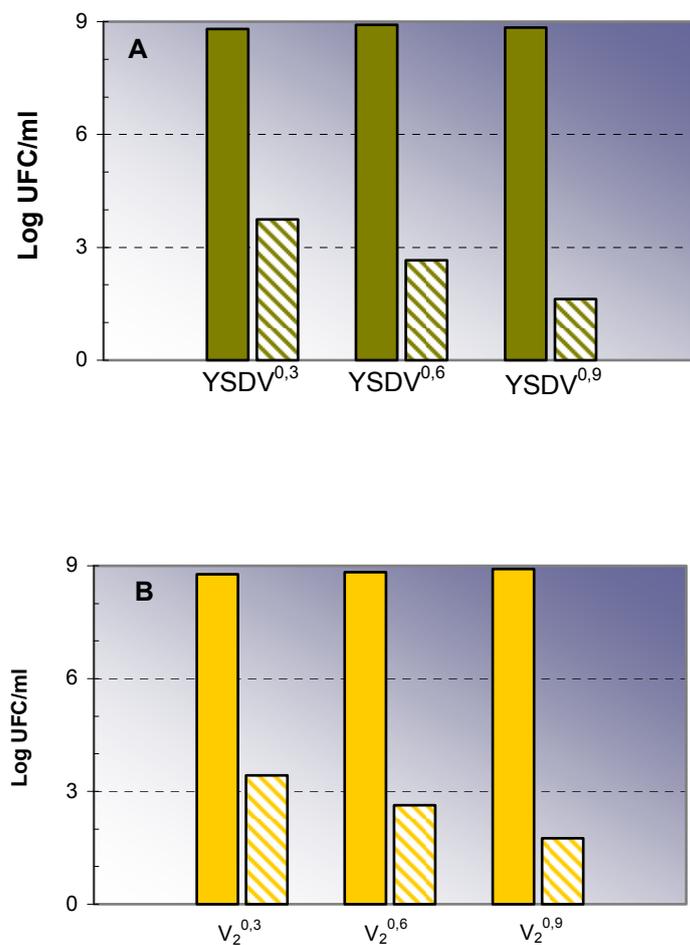


Fig. 33. Estabilidad (metodología **b**) de derivados adaptados a bilis de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (A) y su mutante V_2 (B). Recuentos en agar MRS de los cultivos en caldo MRS adicionado (▨) o no (■) de bilis (0,3%, 0,6% ó 0,9%), luego de seis repiques en caldo MRS.



Fig. 34. Morfología celular de la cepa fago-sensible *Lb. delbrueckii* Ab₁ (A), y su derivado Ab₁^{0.9} adaptado a 0,9% de bilis (B). Fotografías obtenidas por observación en microscopio óptico de contraste de fases (1000 x).

IV.9.4. Confirmación de la fagorresistencia y tasas de adsorción

Los derivados Ab₁^{0.3}, Ab₁^{0.6} y Ab₁^{0.9} conservaron su sensibilidad hacia el fago YAB (Tabla 22). Asimismo, los derivados adaptados a bilis del mutante fagorresistente A₁₇ (A₁₇^{0.3}, A₁₇^{0.6} y A₁₇^{0.9}) presentaron idéntica resistencia fágica que la variante original. Sin embargo, el mutante A₇ presentó modificaciones respecto a su resistencia fágica. Así, mientras que los derivados A₇^{0.3} y A₇^{0.6} conservaron la fagorresistencia, el derivado A₇^{0.9} perdió esta propiedad, volviéndose sensible al fago YAB.

Cuando se evaluaron las tasas de adsorción de los derivados estables obtenidos, se lograron los resultados que se exhiben en la Tabla 22. Confirmando los resultados observados durante el estudio de la fagorresistencia, el derivado A₇^{0.9} fue el único que exhibió cambios en cuanto a los niveles de adsorción del fago YAB, ya que éste se elevó desde 0% a 99,2%, justificando la reversión hacia la sensibilidad fágica.

IV.9.5. Curvas de crecimiento

La Fig. 35 ilustra las cinéticas de crecimiento de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus derivados adaptados a 0,3 y 0,9% de bilis, en caldo MRS adicionado de 0,3 y 0,9%

de bilis, durante 28 h a 37°C. Este comportamiento es representativo del exhibido por los demás derivados aislados.

La cepa Ab₁ (no adaptada) no tuvo la capacidad de desarrollar en presencia de bilis. Por otro lado, su derivado adaptado Ab₁^{0,3} presentó un muy buen desarrollo en presencia de 0,3% de bilis y un escaso desarrollo en presencia de 0,9% de este compuesto. El derivado Ab₁^{0,9} demostró, por su parte, un excelente desarrollo, tanto en presencia de 0,3% como 0,9% de bilis.

Tabla 22. Sensibilidad fágica y tasas de adsorción en los derivados con resistencia incrementada a bilis, obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y de sus mutantes fagorresistentes A₇ y A₁₇.

Cepa original/ Derivado adaptado a bilis	Sensibilidad al fago YAB	% de Adsorción ^a
Ab₁	+	99,30 ± 0,50
Ab ₁ ^{0,3}	+	99,15 ± 0,25
Ab ₁ ^{0,6}	+	98,80 ± 0,30
Ab ₁ ^{0,9}	+	99,10 ± 0,50
A₇	-	0
A ₇ ^{0,3}	-	0
A ₇ ^{0,6}	-	0
A ₇ ^{0,9}	+	99,20 ± 0,20
A₁₇	-	0
A ₁₇ ^{0,3}	-	0
A ₁₇ ^{0,6}	-	0
A ₁₇ ^{0,9}	-	0

^a: Valor promedio de tres determinaciones ± desviación standard.

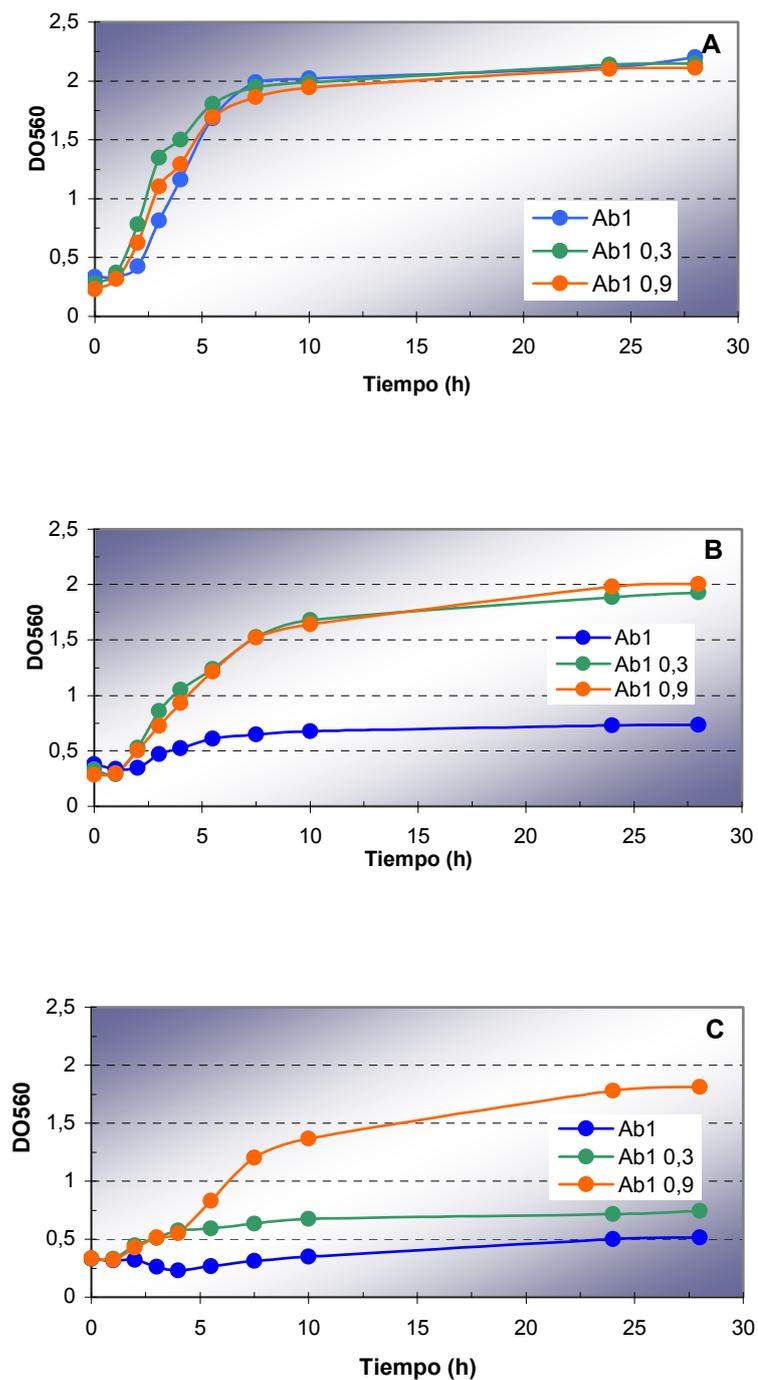


Fig. 35. Cinéticas de crecimiento de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus derivados adaptados a 0,3% y 0,9% de bilis en caldo MRS, sin el agregado (A) o con agregado de 0,3% (B) o 0,9% de bilis (C).

IV.9.6. Actividad acidificante y proteolítica

Los derivados estables adaptados a bilis mantuvieron ($P > 0,05$) las propiedades tecnológicas de las cepas originales, en cuanto a la actividad proteolítica, pH y acidez alcanzados a las 24 h (Tabla 23).

De manera similar a las cepas originales, los derivados adaptados a bilis de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y de su mutante fagorresistente A₇ presentaron una elevada acidificación de la leche a las 24 h (entre 1,54 y 1,75 % de ácido láctico), oscilando los valores de pH entre 3,95 y 4,10, con una actividad proteolítica elevada. Los derivados A₁₇^{0,3}, A₁₇^{0,6} y A₁₇^{0,9} mostraron un escaso desarrollo de acidez en la leche (aproximadamente 0,35% de ácido láctico), y lógicamente, muy escasa actividad proteolítica (A₃₄₀ aproximada a 0,10), al igual que el mutante fagorresistente original (A₁₇).

Tabla 23. Valores de pH, acidez y actividad proteolítica, desarrolladas en LDR, para derivados con resistencia incrementada a bilis, obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y de sus mutantes fagorresistentes A₇ y A₁₇.

Cepa original/ Derivado adaptado a bilis	pH ^{a, b}	Actividad Acidificante ^{a, b} (% ácido láctico)	Actividad Proteolítica ^{a, b} (OPA Test, A ₃₄₀)
Ab₁	3,98 ± 0,10	1,76 ± 0,09	0,56 ± 0,04
Ab ₁ ^{0,3}	4,02 ± 0,03	1,56 ± 0,10	0,49 ± 0,03
Ab ₁ ^{0,6}	4,05 ± 0,05	1,69 ± 0,06	0,53 ± 0,02
Ab ₁ ^{0,9}	4,06 ± 0,02	1,75 ± 0,04	0,52 ± 0,04
A₇	3,92 ± 0,10	1,72 ± 0,07	0,53 ± 0,05
A ₇ ^{0,3}	3,95 ± 0,05	1,62 ± 0,05	0,45 ± 0,01
A ₇ ^{0,8}	4,10 ± 0,01	1,68 ± 0,02	0,50 ± 0,03
A ₇ ^{0,9}	4,03 ± 0,10	1,54 ± 0,09	0,48 ± 0,06
A₁₇	5,66 ± 0,15	0,36 ± 0,01	0,08 ± 0,01
A ₁₇ ^{0,3}	5,72 ± 0,10	0,37 ± 0,02	0,09 ± 0,05
A ₁₇ ^{0,7}	5,77 ± 0,06	0,35 ± 0,03	0,10 ± 0,01
A ₁₇ ^{0,9}	5,78 ± 0,03	0,34 ± 0,03	0,10 ± 0,02

^a: Valores alcanzados por los cultivos en LDR (incubación a 42°C durante 24 h).

^b: Valores promedio de tres determinaciones ± desviación standard.

DISCUSIÓN

Las bacterias lácticas son usadas en una gran variedad de procesos fermentativos industriales, gracias a su capacidad para transformar numerosos sustratos en productos complejos o en moléculas específicas. En principio, cualquier proceso industrial y tecnológico que dependa de fermentaciones bacterianas será vulnerable a los ataques por fagos. Uno de los mayores problemas a los cuales se enfrenta la industria láctea fermentativa es el ataque de los cultivos starters por parte de bacteriofagos. Los fagos pueden atacar a estas BAL, produciendo su lisis y conduciendo a menor producción de acidez e incluso frenando totalmente el proceso fermentativo. Así, los bacteriofagos representan una amenaza constante, que deriva en pérdidas económicas importantes para la industria láctea fermentativa. Por más de 70 años, los microbiólogos han intentado eliminar, o al menos controlar la presencia de los bacteriofagos, los cuales interfieren en la elaboración de productos lácteos fermentados (Moineau y col., 2002; Moineau y Lévesque, 2005). Ya que los fagos son ubicuos en los ambientes lácteos, actualmente se intenta moderar o controlar su multiplicación, en vez de erradicarlos. Las medidas de control incluyen limpieza del ambiente industrial, uso de sanitizantes, ventilación adecuada, uso de medios inhibidores de fagos, rotación de cultivos y obtención y uso de cultivos con resistencia fágica mejorada. Desde el descubrimiento de los primeros fagos de BAL en 1936 por Whitehead y Cox, rápidamente se dedujo que una solución simple para combatir los ataques fágicos era la obtención de cepas con resistencia fágica mejorada. Sin embargo, en muchos casos el fenotipo fagorresistencia de los mutantes obtenidos revertía con los sucesivos repiques, o presentaban pérdida de sus propiedades tecnológicas (capacidad proteolítica y acidificante) (Whitehead, 1953; Limsowtin y Terzaghi, 1976; Jarvis, 1981). Además, en algunos casos era imposible aislar variantes fagorresistentes. Aún así, en ciertas oportunidades los mutantes espontáneos fagorresistentes aislados demostraban ser estables por períodos prolongados, y no eran atacados por fagos (Limsowtin y Terzaghi, 1976; Jarvis, 1981). En los años '80 y '90, las técnicas "naturales" se fueron abandonando, y las investigaciones se orientaron hacia el desarrollo y el uso de la ingeniería genética. De esta forma, se obtuvieron muchas cepas de *Lactococcus* con resistencia fágica mejorada, principalmente por medio de tecnología de ADN recombinante (Hansen, 2002; McGrath y col., 2002), o por inserción de plásmidos que codificaban para distintos mecanismos de fagorresistencia (Hill, 1993; Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Allison y Klaenhammer, 1998; Pillidge y col., 2000). Sin embargo, el uso de estas cepas modificadas genéticamente no se ha

extendido, ya que existen restricciones legales que impiden su utilización en alimentos. Además, en los últimos años se ha regresado al concepto de productos "naturales", por lo que el consumidor difícilmente acepte un alimento que contenga cultivos ingenierizados. Es así que, actualmente, se está volviendo al viejo concepto de la obtención de cepas mejoradas utilizando metodologías naturales, que no impliquen manipulación genética. En este aspecto y como fue comentado anteriormente, una de las estrategias más simples y naturales que puede aplicarse se basa en la obtención de mutantes resistentes a fagos a partir de cepas fago-sensibles. Las variantes fagorresistentes obtenidas son seleccionadas de manera espontánea a partir de una población bacteriana predominantemente fago-sensible. No obstante, a pesar de todas las ventajas de esta metodología, ha sido escasamente utilizada para cepas de lactococos, debido a inconvenientes como disminución de la velocidad y capacidad de acidificación en leche, así como reversión del fenotipo fagorresistencia (Moineau, 1999).

La industria láctea fermentativa utiliza ampliamente cultivos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* para la elaboración de leches fermentadas y quesos. Como puede suponerse, estas dos subespecies de *Lb. delbrueckii* no escapan a la problemática de las infecciones fágicas y en nuestro laboratorio, recientemente fueron aislados los primeros tres fagos argentinos de *Lb. delbrueckii* a partir de elaboraciones fallidas de leches fermentadas (Quiberoni y col., 2003).

Las micrografías electrónicas del fago BYM, lítico de *Lb. delbrueckii* YSD V, revelaron la presencia de una cabeza isométrica, cola larga y no contráctil, y una estructura de collar. En el caso de los fagos YAB e Ib₃, líticos de *Lb. delbrueckii* Ab₁ e Ib₃ respectivamente, esta estructura no se presenta, pero el resto de las características son similares, lo que permitió clasificarlos taxonómicamente dentro del grupo B de Bradley (1967) y en el morfotipo B1 de la familia *Siphoviridae*, según el criterio de Ackermann (1984). Se han observado similitudes a nivel morfológico entre los fagos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. Estudios realizados sobre el fago LL-H (lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*) (Alatossava y col., 1998) y el fago ch2 (lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH2) (Chow y col., 1988) mostraron características en común: ambos poseen cabezas de 50 nm de diámetro, colas largas

no contráctiles de 170 a 180 nm de longitud, y un genoma de 34 a 35 kb. Asimismo, las partículas del fago lb539, lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326, poseen una cabeza icosaédrica de 47 nm y una cola larga, no contráctil de 159 nm. Por todas estas características morfológicas, el fago lb539 también se clasifica dentro de la familia *Siphoviridae* (según Ackermann), y en el grupo B1 de la clasificación de Bradley (1967). Muchos fagos son capaces de atacar tanto a cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, lo que indica que el rango de huéspedes no se limita necesariamente a una subespecie. Este hallazgo es consistente con el alto grado de similitud entre *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Jarvis, 1989).

Se obtuvieron los perfiles de restricción de los tres fagos autóctonos de *Lb. delbrueckii*, utilizando distintas endonucleasas, lo que permitió confirmar que se trata de tres fagos distintos. Sin embargo, se pudo observar que los fagos BYM y YAB poseen algunas bandas en común, y lo mismo ocurre entre los fagos YAB e lb₃. También se calculó el tamaño del genoma de estos tres fagos, los cuales oscilaron entre 31 y 34 kb. El peso molecular del fago ch2 (lítico de *Lb. bulgaricus* CH2) se calculó en 35 kb (Chow y col., 1988). El fago LL-H, lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, posee un tamaño de genoma de 34,6 kb (Alatossava y col., 1998). Un valor similar (35 kb) fue calculado para el fago lb539 (lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 539) (Auaad y col., 1997).

Cuando se estudió la naturaleza de los sitios de empaquetamiento, no se observaron fragmentos submolares en el ADN no ligado del fago YAB (se observan las mismas bandas para el ADN ligado y sin ligar), por lo que se deduce que los extremos de su ADN no son cohesivos. Lo mismo puede decirse del fago BYM, aunque en este caso el perfil obtenido no tuvo la nitidez suficiente, pero su ADN aparentemente no presentaría extremos cohesivos. En el caso del fago lb₃, se pudo observar que al ligar el ADN desaparecieron dos bandas (fracciones submolares de 1 y 2,9 kb), que aparecen como una banda de mayor peso molecular (de 4 kb), en el perfil ligado (correspondiente a la suma de los dos fragmentos submolares observados en el perfil no ligado). En un principio, se pensó que las moléculas de ADN del fago LL-H (lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*) eran circulares (con extremos cohesivos), pero esto fue refutado posteriormente mediante microscopía electrónica, mediante la cual se observó que, por el contrario, el ADN de este fago poseía extremos constantes (*pac*

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

Sin dudas, la fagorresistencia de las bacterias lácticas es importante por sus implicancias tecnológicas y económicas. La resistencia fágica de lactococos fue estudiada en detalle (Neve, 1996; Moineau, 1999; Moineau y col., 2002), pero son todavía escasos los estudios similares en lactobacilos (Carminati y col., 1993; Reinheimer y col., 1993; Quiberoni y col., 1998a, 1998b).

Considerando la importancia de la problemática de las infecciones fágicas que atacan cepas de gran valor comercial, uno de los objetivos principales del presente trabajo fue el aislamiento y el estudio de mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de cepas de *Lb. delbrueckii* fago-sensibles.

De las dos metodologías utilizadas, se observó que el aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes confirmados fue generalmente más efectivo cuando se usó cultivos secundarios (CS) en comparación con medio agarizado (MA). A partir de CS, fue posible obtener una elevada eficiencia de recuperación de mutantes fagorresistentes aislados de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁. Sin embargo, la eficiencia de recuperación de ambas técnicas fue similar en el caso de las variantes aisladas a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃. La mayor efectividad de la técnica de CS obtenida en este trabajo, coincide con trabajos precedentes. Uno de ellos describe el aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes de *Lb. helveticus* ATCC 15807, utilizando los fagos líticos hv y ATCC 15807-B1 (Quiberoni y col., 1998b). Esta técnica también ha sido efectiva para el aislamiento de variantes espontáneas fagorresistentes a partir de cepas de *S. thermophilus* (Binetti, 2001). Recientemente, se reportó una estrategia "natural" alternativa para la obtención de variantes de *S. thermophilus* con resistencia fágica mejorada, la cual utiliza en forma combinada inmunología y citometría de flujo (Viscardi y col., 2003), permitiendo obtener mutantes con propiedades tecnológicas adecuadas. Sin embargo, requiere de un equipamiento costoso.

Las variantes espontáneas con elevada estabilidad de fagorresistencia son la base para la formulación de cultivos iniciadores de composición conocida. En el presente trabajo, los mutantes fagorresistentes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* YSD V y Ab₁ presentaron elevada estabilidad de la fagorresistencia, ya que 100% y 95% de sus respectivos mutantes alcanzaron el séptimo repique sin presentar lisis. En cambio, las variantes aisladas a partir de *Lb. delbrueckii* lb₃ fueron menos estables, y menos de la mitad de éstas (42%) fueron capaces de resistir hasta el séptimo repique bajo presión fágica sin presentar lisis. Por otro lado, los mutantes fagorresistentes aislados por Quiberoni y col. (1998b) usando el fago hv, presentaron baja estabilidad de la fagorresistencia, ya que el 84,6% desarrolló hasta el tercer repique, y sólo el 15,4% mostró resistencia hasta el último repique. En el caso de los mutantes aislados a partir de distintas cepas de *S. thermophilus*, la estabilidad del fenotipo fagorresistencia fue dependiente de cada grupo de mutantes estudiado, oscilando entre 0 y 100% los mutantes que alcanzaron el último repique sin observarse lisis bacteriana (Binetti, 2001).

Teniendo en cuenta el criterio de clasificación de Moineau (1999), los valores de EOP obtenidos para los mutantes de *Lb. delbrueckii* aislados en el presente trabajo, correspondieron a un nivel de fagorresistencia elevado ($EOP < 4,4 \cdot 10^{-8}$), al igual que lo demostrado por Quiberoni y col. (1998b) para mutantes espontáneos fagorresistentes aislados a partir de la cepa ATCC 15807 de *Lb. helveticus* y Reinheimer y col. (1993) para variantes fagorresistentes de *Lb. helveticus* CNRZ 328 (usando el fago hv).

Una vez analizados la estabilidad del fenotipo fagorresistencia de los mutantes aislados y el nivel de fagorresistencia (EOP), se procedió al estudio de los mecanismos (extra o intracelulares) involucrados en la resistencia fágica. En el presente trabajo, no fue posible detectar fagos libres en los sobrenadantes de cultivos en caldo de los mutantes fagorresistentes, indicando ausencia de liberación espontánea de fagos. Esto sugiere la ausencia de mecanismos de fagorresistencia ligados a lisogenia entre los mutantes estudiados. Algo similar fue descrito para las variantes fagorresistentes aisladas a partir de *Lb. helveticus* ATCC 15807 (Quiberoni y col., 1998b). Por el contrario, se demostró que la lisogenia se encuentra extendida entre las cepas de lactococos (Josephsen y Neve, 1998) y también se demostró su presencia en cepas de *S. thermophilus*, aunque en menor proporción (Klaenhammer, 1984; Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). Los mutantes espontáneos fagorresistentes aislados a partir de *S.*

thermophilus St 149 revelaron mecanismos de fagorresistencia ligados a lisogenia (Binetti, 2001).

Al estudiar la adsorción de los fagos sobre los mutantes aislados, se observó que aquellos obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ fueron parcial o completamente incapaces de adsorber fagos, indicando la presencia de interferencia en la adsorción como mecanismo de resistencia fágica. De manera similar, otros autores reportaron adsorción disminuida como mecanismo de fagorresistencia entre mutantes espontáneos aislados a partir de *Lb. helveticus* ATCC 15807 (Quiberoni y col., 1998b) y *Lb. helveticus* CNRZ 892 (Neviani y col., 1992). Posiblemente, existe una relación entre fagorresistencia y mutaciones puntuales en el genoma bacteriano. Además, la disponibilidad de los receptores fágicos podría verse enmascarada por la producción de alguna sustancia que se distribuya en la superficie bacteriana, conduciendo a la disminución en la eficiencia de adsorción (Moineau y Lévesque, 2005). Sin embargo, a diferencia de lo observado para las variantes aisladas de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁, aquellas obtenidas a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, revelaron elevadas tasas de adsorción. Esto indica que la fagorresistencia de estos mutantes no fue debida a un bloqueo en la adsorción fágica. De la misma manera, en trabajos precedentes, los mutantes aislados a partir de cepas de *S. thermophilus* presentaron, en general, niveles de adsorción elevados (entre 80 y 100%), con algunas excepciones, en cuyos casos las tasas de adsorción oscilaron entre 39 y 50% (Binetti, 2001). Las elevadas tasas de adsorción sugieren la existencia de mecanismos de interferencia en la inyección del ADN fágico, la presencia de algún mecanismo de resistencia intracelular (tipo R/M o Abi), o una combinación de ambos tipos de mecanismos. Por último, los mutantes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* lb₃ revelaron tasas de adsorción distribuidas heterogéneamente, siendo muy elevada en algunos casos (cercanas al 100%), y muy bajas en otros (entre 0 y 20%).

Es sabido que las tres subespecies de *Lb. delbrueckii* (subsp. *delbrueckii*, subsp. *lactis* y subsp. *bulgaricus*), poseen más del 80% de homología en su ADN. Se han aplicado distintos métodos moleculares con el objetivo de diferenciar e identificar estas tres subespecies. El análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA) ha sido utilizado exitosamente para la diferenciación de las distintas especies de lactobacilos (Drake y col., 1996; Giraffa y col., 1998; Roy y col., 2001). Esta técnica fue

aplicada por Giraffa y col. (1998), con el objetivo de identificar las tres subespecies de *Lb. delbrueckii*. Según estos autores, ARDRA demostró ser una técnica rápida y confiable para identificarlas y diferenciarlas de *Lb. helveticus* y *Lb. acidophilus*, usando la enzima *EcoRI*. En el presente trabajo de tesis, los perfiles ARDRA revelaron que dos de las tres cepas identificadas a nivel comercial como *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* eran, en realidad, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. De esta manera, las cepas Ab₁ e Ib₃, así como sus respectivos mutantes fagorresistentes, fueron reclasificados como *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, mientras que YSD V y sus mutantes espontáneos fueron confirmados como cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

El uso de RAPD-PCR se ha popularizado debido a las ventajas que presenta. Se trata de una metodología rápida y sensible, ampliamente utilizada para la tipificación de cepas del género *Lactobacillus* (Quiberoni y col., 1998a, 1998c; Torriani y col., 1999; Giraffa y col., 2004; Rossetti y Giraffa, 2005). El análisis de los perfiles RAPD fue utilizado para observar la diversidad o polimorfismo existente entre cepas de *Lb. helveticus* aisladas a partir de suero-fermentos obtenidos de elaboraciones de quesos duros argentinos (Quiberoni y col., 1998a, 1998c) o italianos (Giraffa, 1998). Además, esta técnica ha demostrado ser útil para reconocer cepas de *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en cultivos mixtos (Cocconcelli y col., 1997; Giraffa y col., 1997; Giraffa y Rossetti, 2004). En el presente trabajo, la comparación de los perfiles RAPD obtenidos, permitió revelar clusters bien definidos para cada grupo de mutantes fagorresistentes y sus cepas madres fago-sensibles, con altos coeficientes de similitud en cada caso (> 94%). Por lo tanto, los mutantes fagorresistentes resultaron muy similares, genéticamente, a sus cepas madres correspondientes, confirmando que cada grupo de mutantes estudiado derivó de las mismas, y que no existió ningún tipo de contaminación externa.

Como es sabido, la identificación de las subespecies *lactis* y *bulgaricus* de *Lb. delbrueckii*, en particular si ésta se basa sólo en sus características fenotípicas (fermentación de azúcares, por ejemplo), puede ser problemática. Con el advenimiento de las técnicas que estudian el ADN bacteriano, este problema ha sido resuelto en gran medida (Giraffa y col., 1998; Torriani y col., 1999). Sin embargo, estas metodologías resultan costosas. El análisis de las proteínas totales de la pared bacteriana a través de SDS-PAGE se ha ido perfeccionando, y hoy en día permite la

identificación de distintas especies de bacterias lácticas. En este sentido, Gatti y col. (1997, 2001) diseñaron un método basado en el análisis de las proteínas de la pared bacteriana, para la discriminación entre cepas de *Lb. helveticus* y *Lb. delbrueckii*, así como la diferenciación entre *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. En el presente trabajo de tesis, el análisis de las proteínas de la pared celular bacteriana se realizó como una metodología confirmatoria adicional de ambas subespecies. Según nuestros resultados, las cepas madres estudiadas revelaron dos tipos de perfiles. Dos de ellas, Ab₁ e lb₃, revelaron un perfil compuesto por una sola proteína de 18 kDa, al igual que la cepa control de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ILC 232. Por otro lado, la cepa madre fago-sensible YSD V reveló un perfil conformado por una proteína de masa molecular aproximada de 31 kDa, mientras que la cepa control de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ILC 333, presentó un "doblete" compuesto por dos proteínas de 30 y 31 kDa. Según los estudios realizados por Gatti y col. (2001), ambos tipos de perfiles (una única proteína de 31 kDa o dos de 30 y 31 kDa) son característicos de cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Como se ha afirmado en otros trabajos, en nuestro caso el análisis de las proteínas de la pared bacteriana resultó ser una herramienta taxonómica muy útil para la identificación rápida de las subespecies de *Lb. delbrueckii*.

Al analizar la morfología de las cepas estudiadas en este trabajo, se encontró que los mutantes espontáneos fagorresistentes aislados a partir de las tres cepas fago-sensibles de *Lb. delbrueckii*, mostraron similar morfología (celular y de las colonias) e idéntico perfil de fermentación de azúcares que sus respectivas cepas madres.

Cuando se estudiaron las propiedades tecnológicas (actividad acidificante y proteolítica y velocidad de acidificación en leche) de las variantes fagorresistentes, se observó que todos los mutantes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* lb₃ fueron similares a sus cepas madres. Sin embargo, a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ se obtuvieron dos grupos de mutantes con distinto desempeño tecnológico. Aquellos mutantes clasificados como "lentos", no fueron capaces de coagular la leche, revelando escasa actividad proteolítica, elevados valores de pH luego de 24 h de incubación a 42°C en leche, y por ende, baja velocidad de acidificación. No obstante, la mayoría de los mutantes aislados de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ fueron clasificados como "rápidos",

revelando cinéticas de acidificación, valores de actividad proteolítica y actividad acidificante similares a las obtenidas a partir de la cepa madre. Las variantes fagorresistentes "lentas" fueron capaces de acidificar y coagular la leche de manera similar a la cepa madre cuando fueron desarrollados en LDR adicionada de hidrolizado de caseína (LRD-HC). Esto sugiere que las variantes "lentas" aisladas podrían ser deficientes en actividad proteolítica, porque al adquirir el fenotipo fagorresistencia puede haberse modificado la configuración de la pared celular, perdiendo, quedando enmascaradas o inactivas ciertas enzimas proteolíticas esenciales para desarrollarse. Por otro lado, el agregado de glucosa (1%) mejoró levemente la capacidad acidificante de los mutantes "lentos". Es sabido que la lactosa es un dímero formado por una molécula de lactosa y una de galactosa. Los lactobacilos utilizan sólo la fracción glucosa de la lactosa. En circunstancias normales, los lactobacilos tienen preferencia por el transporte de lactosa en vez de glucosa, realizado a través de un sistema de permeasas (Zourari y col., 1992; Chervaux y col., 2000). Sin embargo, en el caso de las variantes fagorresistentes, es posible que ese sistema se encuentre enmascarado o se haya perdido (de manera similar a las proteasas), cobrando importancia el transporte de la glucosa, y explicando en parte la disminución del pH observada en los mutantes inoculados en LDR-Glu. Se ha experimentado el uso de mutantes fagorresistentes en la industria láctea como forma de controlar las infecciones fágicas, aunque en ciertos casos estas variantes presentan pérdida de las propiedades acidificante y proteolítica (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). Para los mutantes espontáneos fagorresistentes aislados a partir de cepas comerciales de *S. thermophilus*, las propiedades tecnológicas estudiadas (evolución del pH en leche, actividades acidificante y proteolítica) no ofrecieron diferencias significativas cuando se compararon con sus cepas de origen (Binetti, 2001). La combinación de inmunoselección y citometría también permitió el aislamiento de mutantes fagorresistentes de la cepa Str31 de *S. thermophilus* con adecuadas características tecnológicas (Viscardi y col., 2003).

El concepto de "probiótico" ha evolucionado a través del tiempo. En la actualidad, los probióticos se definen como "microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas otorgan efectos benéficos sobre la salud del consumidor" (Guarner y col., 2005). La mayoría de las bacterias reconocidas como probióticas pertenecen a los géneros *Lactobacillus* (*Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, etc.) y

Bifidobacterium. Sin embargo, *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* también deberían ser considerados como probióticos (Naidu y col., 1999; de Moreno de LeBlanc y Perdigón, 2004).

En los últimos años, los cultivos starters utilizados para la elaboración de yogur poseen cada vez menor proporción de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, obteniéndose productos menos ácidos, con el objetivo de captar un mercado de consumidores más amplio. Sin embargo, en paralelo han ido surgiendo varios trabajos revalorizando el rol de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y subsp. *lactis* como microorganismos con propiedades probióticas (Perdigón y col., 1998; Bibas Bonet y col., 1999; de Moreno de LeBlanc y Perdigón; 2004; Guarner y col., 2005). Estudios recientes han reportado la habilidad de estas bacterias para liberar, entre otros componentes, enzimas (como β -galactosidasa), que mejoran la digestión de los nutrientes en el intestino (Guarner y col., 2005), y también contribuyen al funcionamiento adecuado del sistema inmunológico (Bibas Bonet y col., 1999; de Moreno de LeBlanc y Perdigón, 2004), el cual juega un rol positivo en la salud humana. Por esta razón, si consideramos la definición de una bacteria *probiótica*, y el hecho de que *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* han sido tradicionalmente utilizados en productos lácteos fermentados generando beneficios sobre la salud humana, se torna interesante estudiar el verdadero potencial probiótico de cepas que pertenecen a estas especies, ya que la literatura exhibe datos controversiales (del Campo y col., 2005).

En el estómago son secretados aproximadamente 2,5 litros de jugo gástrico por día, cuyo pH es cercano a 2. Esta solución ácida causa la destrucción de la mayoría de los microorganismos ingeridos. En consecuencia, la resistencia a la acidez estomacal por parte de las bacterias probióticas es un criterio de selección importante (Charteris y col., 1998; Schillinger y col., 2005). Por otro lado, los alimentos principales que contienen bacterias probióticas suelen ser yogur y leches fermentadas, los cuales presentan pH relativamente bajos (Tuomola y col., 2001). Estas razones avalan la importancia de evaluar la capacidad de las cepas potencialmente probióticas para resistir a un ambiente ácido. La exposición de las cepas sensibles a fagos de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagoresistentes al jugo gástrico simulado (pH 2) durante 90 min de incubación, condujo a una pérdida importante en la viabilidad de las cepas. Estos resultados son coincidentes con aquellos obtenidos por Vinderola y Reinheimer

(2003), en donde las pérdidas de viabilidad por parte de cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fueron incluso mayores, oscilando entre 4,8 y > 6 órdenes logarítmicos en jugo gástrico simulado de pH 2. Estos valores no son sorprendentes, ya que ciertas cepas probióticas bien estudiadas, como *Lb. rhamnosus* GG, no fue capaz de sobrevivir en este sistema *in vitro* a pH 2, aunque resistió las condiciones ácidas a pH 3. La supervivencia en el estómago de las bacterias ingeridas está obviamente influenciada por la capacidad buffer de los componentes de la matriz del alimento que actúa como vehículo de estas bacterias. Es así como *Lb. rhamnosus* GG (Goldin y Gorbach, 1992), *Lb. acidophilus* UO 001 y *Lb. gasseri* UO 002 (Fernández y col., 2003) y otras cepas de *Lactobacillus* (*casei*, *paracasei*, *rhamnosus*, *johnsonii*, *plantarum*) (Schillinger y col., 2005; Vizoso Pinto y col., 2006) fueron capaces de sobrevivir en jugo gástrico simulado en presencia de leche. En concordancia, en el presente trabajo de tesis se observó un efecto positivo de la leche en la viabilidad de las cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes espontáneos incubados en jugo gástrico simulado. Efectos similares fueron obtenidos previamente sobre otras BAL cuando se agregó leche descremada a jugo gástrico de origen humano (Charteris y col., 1998). Por otro lado, el desarrollo previo de estas cepas en LDR no produjo ningún efecto positivo sobre su capacidad de tolerar la acidez del jugo gástrico artificial.

Durante la primera hora de digestión luego del consumo de un alimento, la concentración de bilis oscila entre 1,5 y 2% (p/v), disminuyendo luego hasta 0,3 - 0,5% (Noriega y col., 2004). Las sales biliares son detergentes biológicos que actúan emulsificando y solubilizando lípidos. Tienen la capacidad de afectar los fosfolípidos y proteínas de las membranas celulares, provocado un desequilibrio en la homeostasis celular. Gracias a estas propiedades, la bilis posee una gran capacidad antimicrobiana, jugando un importante papel en el sistema de defensa del organismo (Begley y col., 2005; Noriega y col., 2005). Por ende, se considera necesario evaluar la resistencia de las potenciales bacterias probióticas a la misma (Dunne y col., 1999). Las cepas madres de *Lb. delbrueckii* y los derivados fagorresistentes usados en este trabajo, revelaron escasa tolerancia a bilis, incluso a bajas concentraciones, desarrollando entre 2,9 y 15,1% respecto al control, en presencia de 0,3 y 0,5% de bilis. Sin embargo, en el trabajo realizado por Vinderola y Reinheimer (2003), la resistencia a bilis de cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* resultó ser más elevada.

La lisozima está presente en la cavidad oral e intestinos, siendo capaz de lisar ciertas especies de bacterias (Kimoto y col., 2000). En este trabajo, la lisozima fue bien tolerada por *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y sus respectivos derivados resistentes a fagos, los cuales exhibieron un desarrollo apreciable, incluso en presencia de elevadas concentraciones de esta enzima (100 ppm). Por el contrario, el desarrollo de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y su mutante espontáneo I₃₉ fue inhibido en presencia de lisozima, incluso a bajas concentraciones de la enzima. A pesar de esto, los resultados superan los valores mínimos considerados satisfactorios para el status de probiótico (Goldin y Gorbach, 1992).

Los *prebióticos* son ingredientes alimenticios no digeribles que benefician la salud, ya que propician el desarrollo selectivo y/o la actividad de ciertas bacterias del colon. Los prebióticos estimulan el desarrollo de un limitado número de bacterias ya existentes en la microflora de un intestino saludable (Saxelin y col., 2003). Dentro de las sustancias consideradas como prebióticas se incluyen lactulosa, inulina, oligosacáridos de la soja (rafinosa), xilooligosacáridos (xilosa), entre otros. En el presente trabajo, los compuestos prebióticos fueron utilizados por las cepas de *Lb. delbrueckii* estudiadas con distintas eficiencias, siendo la inulina el más fermentado por la mayoría de las cepas (entre 40 y 79,5%). La excepción fue el mutante A₇, que utilizó la lactulosa con mayor eficiencia. El segundo prebiótico más utilizado por la mayoría de las cepas fue justamente la lactulosa, siendo el xilitol y la rafinosa escasamente fermentados (<12%). También se ha observado que la inulina y oligofruktosa estimularon el sistema inmunológico en ratas (Trushina y col., 2005), mientras que otros autores observaron que estos compuestos potenciaron la producción de ácidos grasos de cadena corta, favoreciendo el desarrollo de lactobacilos y bifidobacterias. Estos efectos estuvieron asociados con una menor inflamación de la mucosa intestinal. Los prebióticos pueden ofrecer la oportunidad de prevenir enfermedades intestinales inflamatorias crónicas, aunque este hecho requiere llevar a cabo estudios adicionales (Guarner, 2005). En Europa, la inulina y los fructooligosacáridos (oligofruktosa) son ampliamente usados en alimentos lácteos funcionales. Adicionalmente, la presencia de inulina y oligofruktosa en la matriz de un alimento otorga una mejor textura a los productos líquidos (Saxelin y col., 2003).

Posiblemente, la deconjugación de las sales biliares participe en el mantenimiento del equilibrio de la flora intestinal. La hidrólisis de las sales biliares es llevada a cabo por hidrolasas (BHSs) presentes en los microorganismos que forman parte de la microflora intestinal normal (Begley y col., 2005). La actividad de las BSHs puede contribuir a mejorar la resistencia de las BAL respecto a la toxicidad de las sales biliares conjugadas en el duodeno y, por lo tanto, resulta un factor de colonización importante (Schillinger y col., 2005). A pesar de esto, Moser y Savage (2001) demostraron que la resistencia a la toxicidad de las sales biliares no parece estar relacionada con la actividad hidrolítica. Es más, en este trabajo, algunas de las cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes estudiados desarrollaron en presencia de una o ambas sales biliares usadas (taurocolato y taurodeocolato de sodio), pero ninguna de ellas fue capaz de hidrolizarlas. En trabajos previos (Moser y Savage, 2001; Vinderola y Reinheimer, 2003; Minelli y col., 2004) se demostró la presencia de actividad hidrolítica en las cepas de *Lb. acidophilus* y *Lb. johnsonii*, mientras que *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus* GG fueron negativos para BSH en los ensayos en medio agarizado.

La intolerancia a la lactosa, denominada más correctamente “mala digestión de lactosa”, es originada por la producción disminuida de β -galactosidasa en el organismo. Este hecho es normal en los mamíferos adultos, incluyendo al hombre. La aparición de los síntomas de la mala digestión de lactosa está asociada al consumo de leche, pero no al de leches fermentadas. Estas últimas poseen bacterias lácticas que tienen β -galactosidasa. Luego del consumo de estos productos fermentados, las bacterias lácticas pueden ser lisadas por la bilis en el intestino delgado, liberando la enzima capaz de degradar la lactosa (Ouwehand y col., 2002; van de Water, 2003; Saxelin y col., 2003). En este trabajo, la actividad de β -galactosidasa estuvo presente en todas las cepas estudiadas en niveles elevados, especialmente en *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (1370 unidades Miller). Estos resultados confirman aquellos previamente reportados por Vinderola y Reinheimer (2003), donde los mayores valores de producción enzimática se encontraron en cepas de *Lb. delbrueckii*, en comparación con *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *S. thermophilus* y *Lactococcus*. En un trabajo publicado recientemente por Vizoso Pinto y col. (2006), se observó que la cepa ATCC 8014 de *Lb. plantarum* fue la que presentó mayor actividad de esta enzima, en comparación con otras cepas de *Lb. plantarum*, *Lb. johnsonii* y *Lb. paracasei*. La gran variabilidad observada para esta propiedad en las cepas estudiadas, resalta la

importancia de seleccionar a las más apropiadas para usarlas como adyuvantes dietarios.

La hidrofobicidad de la superficie celular de las bacterias podría favorecer la colonización de las superficies mucosas, jugando un rol en la adhesión de las bacterias a las células epiteliales (Schillinger y col., 2005). En este trabajo, la determinación de la hidrofobicidad de las cepas madres y de las variantes fagorresistentes reveló diferencias considerables. Los valores obtenidos fueron distintos para los tres grupos formados por las cepas madres fago-sensibles de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes fagorresistentes. *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y su mutante fagorresistente I₃₉ presentaron los valores más elevados (62,5% en promedio), mientras que *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y su mutante V₂, los más bajos (6,5% en promedio). Estudios minuciosos de la pared celular de las cepas de *Lb. johnsonii*, *Lb. crispatus* y *Lb. helveticus* demostraron una gran variación en los valores de hidrofobicidad (Schar-Zammaretti y Ubink, 2003). Otros autores (Pelletier y col., 1997; Vinderola y Reinheimer, 2003) determinaron en cepas de *Lb. acidophilus* y *Bifidobacterium* mayores valores de hidrofobicidad, en comparación con otras de *Lb. casei* y *Lb. rhamnosus*. Schillinger y col. (2005) observaron que las cepas con mayores niveles de hidrofobicidad presentaban, en general, mayores niveles de adhesión a células HT29 MTX. Sin embargo, *Lb. acidophilus* BFE 719, caracterizada por presentar valores muy bajos de hidrofobicidad, reveló buena capacidad de adhesión, por lo que una elevada hidrofobicidad no es siempre sinónimo de elevado nivel de adhesión. En estudios realizados por Vinderola y col. (2004) no se halló correlación entre hidrofobicidad, interacción con sitios específicos en el intestino, capacidad inmunomoduladora, y perfil de proteínas en cepas de lactobacilos, bifidobacterias y enterococos. Como puede observarse, la hidrofobicidad es un parámetro muy variable entre especies estrechamente relacionadas, e incluso entre cepas de la misma especie. La hidrofobicidad de la pared celular es una de las propiedades fisicoquímicas que facilita el primer contacto entre los microorganismos y las células huéspedes. Sin embargo, esta interacción inicial inespecífica es reversible, y precede a la adhesión, la cual es mediada por mecanismos más específicos (Roos y Jonsson, 2002). Por lo tanto, la hidrofobicidad puede ser útil para la adhesión, pero no siempre se correlaciona con un alto valor de la misma.

Se han postulado varios mecanismos mediante los cuales las bacterias lácticas y probióticas originan actividad antimicrobiana. Uno de ellos es la producción de sustancias o metabolitos con propiedades inhibitorias contra algunos o varios microorganismos patógenos (Tuomola y col., 2001; Servin, 2004). En el presente trabajo, se encontró que tanto las cepas fago-sensibles de *Lb. delbrueckii*, así como los derivados espontáneos fagorresistentes, revelaron actividad antibacteriana en sus sobrenadantes libres de células (SLC). La actividad antibacteriana *in vitro* se manifestó contra patógenos específicos mediante el ensayo de difusión en agar, a través de la producción de sustancias extracelulares y que difundieron en el medio. Las bacterias patógenas Gram negativas ensayadas (*Salmonella* sp. OMS-Ca y *E. coli* V517), fueron completamente inhibidas, mientras que ambos patógenos Gram positivos (*S. aureus* 76 y *L. monocytogenes* ATCC 15313) fueron parcialmente inhibidos por los SLC. En el caso de las cepas *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ e Ib₃, se observó una mayor actividad antimicrobiana en comparación con sus respectivos mutantes fagorresistentes. Sin embargo, el mutante espontáneo V₂, aislado a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, presentó mayor eficacia contra los patógenos ensayados respecto a la cepa original. Forestier y col. (2001), observaron similar actividad antibacteriana contra patógenos Gram positivos y Gram negativos por parte de *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35. Asimismo, ciertas cepas de *Lb. plantarum* y *Lb. johnsonii* presentaron actividad antimicrobiana contra *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Listeria innocua* y enterococos (Vizoso Pinto y col., 2006). *Lb. acidophilus* UO 001 y *Lb. gasseri* UO 002 inhibieron el desarrollo de ciertas bacterias enteropatógenas, pero no produjeron inhibición de bacterias que conformaban la microflora intestinal normal (*Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Bacteroides fragilis* y *Bifidobacterium bifidum*) (Fernández y col., 2003).

Una vez comprobada la capacidad inhibitoria de los SLCs de las cepas sensibles a fagos de *Lb. delbrueckii* y sus variantes fagorresistentes, se procedió a estudiar la naturaleza de la/s sustancia/s antimicrobiana/s producidas por las mismas. En este análisis, los compuestos inhibitorios liberados por las cepas exhibieron muchas características comparables con aquellas sustancias antimicrobianas producidas por otros lactobacilos: resistencia al tratamiento térmico, mayor actividad en medio ácido que alcalino (Coconnier y col., 1997), resistencia a la acción de proteasas (como pepsina y proteinasa K), y pérdida de sus propiedades inhibitorias al neutralizar con NaOH los SLCs. Según los resultados obtenidos en este trabajo, la actividad

antimicrobiana producida por las cepas de *Lb. delbrueckii* estudiadas, fue de naturaleza termoestable, no proteica y ácida. Esta última característica puede estar relacionada principalmente al ácido láctico producido por las cepas durante su desarrollo. Existen muchos trabajos que reportan resultados similares, por lo que es muy probable que los ácidos orgánicos producidos por las BAL, sean la principal defensa contra microorganismos patógenos (Forestier y col., 2001; Fernández y col., 2003; Makras y col., 2005; Vizoso Pinto y col., 2006). Los halos de inhibición observados para el control de MRS-AL (ácido láctico) (pH 4) fueron más parecidos a los observados con los SLCs que aquellos obtenidos con el control de MRS-HCl (pH 4). El ácido láctico, además de sus características antimicrobianas debidas a su capacidad de disminuir el pH, también funciona permeabilizando la membrana externa de las bacterias Gram negativas, pudiendo incluso potenciar los efectos de otras sustancias antibacterianas presentes (Alakomi y col., 2000).

Se considera que la adhesión de las bacterias lácticas y/o probióticas a la mucosa intestinal es el primer paso para asegurar una colonización temporal del intestino, y así ejercer efectos benéficos sobre la salud (Forestier y col., 2001). Además, las bacterias adheridas podrían ocultar los sitios de unión para patógenos (por exclusión competitiva o impedimento estérico), imposibilitando que éstos se asocien e invadan el epitelio intestinal (Tsai y col., 2005). Ante la dificultad de realizar experiencias *in vivo*, se han desarrollado modelos *in vitro* que permiten evaluar la adhesión bacteriana al epitelio intestinal. Este es el propósito de las líneas celulares HT-29 y Caco-2, aisladas originalmente de adenocarcinoma de colon humano, elegidas usualmente como modelos de células intestinales humanas para los ensayos *in vitro* (Saxelin y col., 2003; Bianchi y col., 2004). En este trabajo, las tres cepas madres de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes espontáneos fagorresistentes, fueron capaces de adherir a células Caco-2/TC-7 con distinta eficiencia. *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus mutantes A₇ y A₁₇ exhibieron los mayores niveles de adhesión (entre 3,8 y 5,8%), mientras que *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃, su variante fagorresistente I₃₉, y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V presentaron menor capacidad de adhesión a las células intestinales (entre 1,1 y 1,8%). No obstante, el mutante espontáneo V₂ presentó mayores niveles de adhesión (3,5%) que la cepa fago sensible de la cual fue aislado. Existen varios trabajos que demostraron adhesión de distintas cepas de *Lactobacillus* a células Caco-2 (Greene y Klaenhammer, 1994; Forestier y col., 2001; Fernández y col.,

2003). Tuomola y Salminen (1998) observaron que *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103, una cepa probiótica de alto valor comercial, presentó 9,7% de adhesión a células Caco-2 respecto al control positivo de *E. coli* H10407, que arrojó un valor de 14,2%. Otras cepas comerciales analizadas en este mismo trabajo presentaron valores menores de adhesión (4,4% para *Lb. casei* Imunitass). Desafortunadamente, en muchos casos los valores de adhesión presentados en distintos trabajos no pueden compararse, debido a la utilización de metodologías diferentes (Forestier y col., 2001).

Actualmente, un problema grave en la terapia con antibióticos es la falta de efectividad de estas drogas contra las bacterias patógenas. Estudios previos (Coconnier y col., 1997; Coconnier y col., 2000) revelaron que cepas de *Lb. acidophilus* desarrollaron actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Para que se manifieste la virulencia de una bacteria patógena, ésta debe ser capaz de adherirse al epitelio intestinal. La inhibición de la adhesión del patógeno a las células intestinales, podría reducir la colonización de las mismas y, en consecuencia, modificar el proceso de patogenicidad (Forestier y col., 2001). En este trabajo, cuando se estudió la capacidad de los SLCs de las cepas de *Lb. delbrueckii* y sus mutantes para inhibir la adhesión e invasión de una cepa de *S. enterica* serovar. Enteritidis a células Caco-2/TC-7, se observó que los componentes antimicrobianos producidos por las cepas en estudio produjeron una disminución marcada en la adhesión del patógeno a las células eucarióticas, aunque fueron más efectivos contra la invasión del patógeno a las mismas. Al realizar el pretratamiento de *Salmonella* con SLCs de las distintas cepas estudiadas, se observó que aquellos obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y sus mutantes fagorresistentes A₇ y A₁₇, fueron muy efectivos en la inhibición de la adhesión e invasión de este patógeno. El resto de los SLCs produjo efectos similares, excepto el mutante I₃₉ (aislado de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃), que presentó menor efectividad para inhibir la invasión del patógeno. Estos resultados son comparables a los reportados previamente por Coconnier y col. (2000) para cepas de *Lb. acidophilus*, aunque estos autores verificaron no sólo la inhibición de la adhesión e invasión, sino también la muerte del patógeno. Makras y col. (2005) observaron que la capacidad antibacteriana de distintas cepas de lactobacilos produjo una inhibición importante de la invasión de *S. typhimurium* SL 1344 sobre células Caco-2/TC-7. En un trabajo publicado por Fernández y col. (2003), se demostró

que *Lb. gasseri* UO 002 fue capaz de inhibir la adhesión de bacterias enteropatógenas *in vitro*. Asimismo, otro trabajo (Lehto y Salminen, 1997) reportó que el pretratamiento de una cepa de *S. typhimurium* con el SLC (pH 4,3) de *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) inhibió la adhesión de este patógeno a células Caco-2. De manera similar, Hudault y col. (1997) demostraron que el sobrenadante de *Lb. casei* GG contenía sustancias antimicrobianas que ejercían un efecto inhibitorio sobre la invasión de *S. typhimurium* C5 a estas mismas células eucarióticas.

La resistencia al tránsito por el tracto gastrointestinal (acidez estomacal, pepsina, sales biliares y lisozima) es uno de los requisitos necesarios para que las bacterias lácticas sobrevivan y lleguen viables al intestino. De esta forma, las BAL pueden ejercer los efectos benéficos sobre la salud, incluyendo modulación del sistema inmune local (Galdeano y Perdigón, 2004). Sin embargo, ciertas evidencias sugieren que en algunos casos, las bacterias no viables también ejercen efectos biológicos similares a aquellos demostrados usando microorganismos viables (Perdigón y col., 2004; Ouwehand y col., 2002; Vinderola y col., 2005). Algunos fragmentos antigénicos de la pared celular bacteriana son capaces de estimular el sistema inmune en la mucosa intestinal (Morata de Ambrosini y col., 1998; Galdeano y Perdigón, 2004). En el presente trabajo de Tesis se observó un incremento en el número de células IgA⁺ en la lámina propia del intestino delgado de ratones para todas las cepas ensayadas. Ciertos trabajos indicaron que la viabilidad celular no es fundamental, ya que tanto células viables y no viables de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produjeron activación inmunológica de la mucosa, revelando un elevado número de células productoras de IgA y citoquinas (Galdeano y Perdigón, 2004). Los efectos inmunológicos producidos por la administración de bacterias probióticas pueden ser estudiados en modelos animales, siendo muy importantes para determinar los efectos de dosis/respuesta (Salminen y col., 1998). Vintiñi y col. (2000) demostraron que las cepas estudiadas fueron capaces de elevar el número de células productoras de IgA en la lámina propia del intestino delgado, y este efecto dependió de la dosis oral del cultivo administrado. En ese caso, se observaron distintos tipos de activación del sistema inmunológico local, siendo cepa-dependiente. Otros estudios también han observado que el tipo de respuesta inmunológica es dependiente de cada cepa (Perdigón y col., 2002). En este trabajo de Tesis, el ensayo de traslocación fue realizado para asegurar la inocuidad de las dosis orales de *Lb. delbrueckii* administradas a los

animales. Se pudo demostrar que las dosis administradas fueron adecuadas, y no causaron traslocación de bacterias a otros órganos. En el caso de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ y sus respectivos mutantes fagorresistentes, se observó un patrón similar de células de IgA⁺ producidas por cada grupo. Por otro lado, los mutantes espontáneos A₇ y A₁₇, aislados de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁, revelaron una mayor capacidad para inducir la producción de células IgA⁺ que su cepa madre. Bibas Bonet y col. (1999) observaron que *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* indujo la producción de mayor cantidad de células IgA⁺ en comparación con *Lb. casei* y *Lb. acidophilus*.

A causa de la toxicidad manifiesta de la bilis sobre las bacterias, la microflora autóctona del intestino ha tenido que desarrollar estrategias para protegerse de su acción inhibitoria. La adaptación fisiológica a elevadas concentraciones de bilis es, en consecuencia, una herramienta muy importante para incrementar la supervivencia de los microorganismos en el tracto gastrointestinal (Sánchez y col., 2004). Se ha demostrado el aislamiento y caracterización de clones tolerantes al ácido y a la bilis, a partir de cepas de *Lb. acidophilus* (Chou y Weimer, 1999) y más recientemente a partir de *Bifidobacterium* (Margolles y col., 2003; Noriega y col., 2004; Sánchez y col., 2004; Gueimonde y col., 2005; Noriega y col., 2005). En el presente trabajo de Tesis, se aislaron derivados con resistencia incrementada a distintas concentraciones de bilis (entre 0,3 y 0,9%), a partir de las cepas sensibles a fagos *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab₁ y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, así como de sus respectivos mutantes fagorresistentes. No fue posible aislar derivados adaptativos a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ib₃ ni de su variante fagorresistente Ib₃₉. Los derivados obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* Ab₁ y sus mutantes fagorresistentes A₇ y A₁₇ conservaron la resistencia a la bilis durante los ensayos de estabilidad realizados. Sin embargo, aquellos aislados de *Lb. delbrueckii* YSD V y su mutante V₂, perdieron la tolerancia a la bilis luego del sexto repique del ensayo. Se ha observado que la encapsulación con sustancias (como proteínas de soja o emulsiones de aceites vegetales) de las cepas aumentó la tolerancia frente a la bilis de las mismas (Begley y col., 2005). Además, la capacidad antibacteriana *in vivo* de la bilis puede ser inferior a la observada en los modelos experimentales (particularmente en medios líquidos), ya que en el organismo las sales biliares se agrupan con fosfolípidos formando miscelas, lo que llevaría a una menor disponibilidad de la bilis para interactuar con las células bacterianas (Begley y col.,

2005). Cuando se estudiaron las propiedades tecnológicas (pH, actividad acidificante y proteolítica en LDR) y la fagorresistencia de todos los derivados aislados de *Lb. delbrueckii* Ab₁, A₇ y A₁₇, se observó que conservaron las características de las cepas originales, con el derivado A₇^{0.9} como única excepción, ya que perdió el fenotipo de fagorresistencia. El comportamiento exhibido por el derivado A₇^{0.9} fue un hallazgo interesante, ya que revirtió al fenotipo de resistencia fágica, demostrando una tasa de adsorción del fago YAB que se elevó desde un valor nulo (mutante fagorresistente A₇, sin adaptación a bilis) hasta 99%. Este hecho podría sugerir que la adaptación a bilis involucró, en este caso al menos, modificaciones a nivel de organización y/o composición de la pared celular bacteriana. Estos cambios se relacionan directamente con la presencia/ausencia, disponibilidad/enmascaramiento de los receptores fágicos ubicados sobre la mencionada envoltura celular. Observaciones similares fueron sugeridas por Gueimonde y col. (2005) para *Bifidobacterium*. Los autores relacionaron los cambios observados en la capacidad de adhesión e hidrofobicidad de derivados de *Bifidobacterium* adaptados a bilis, con cambios metabólicos que generan modificaciones en la composición de la superficie celular bacteriana. Según Margolles y col. (2003), es posible que los cambios observados en las proteínas de la membrana celular afecten otras propiedades, tales como morfología (células más pequeñas y homogéneas en tamaño en la fase estacionaria) y utilización de azúcares. Estudios más profundos en los derivados obtenidos en esta Tesis, permitirán determinar los mecanismos que posibilitan la adquisición de tolerancia a bilis en *Lb. delbrueckii*, y especialmente en mutantes fagorresistentes aislados a partir de cepas sensibles.

De acuerdo a los resultados presentados a lo largo de este trabajo, es posible reafirmar que el aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes es la alternativa más sencilla y "natural" para la obtención de cepas con fagorresistencia mejorada, la cual puede ser aplicada en la actualidad sin restricciones legales. Esta estrategia adquiere aún mayor relevancia en el caso de cultivos probióticos fago-sensibles, ya que el reemplazo de estas cepas es complejo. Los mutantes espontáneos fagorresistentes obtenidos en el presente trabajo presentan, además de una fagorresistencia mejorada, propiedades tecnológicas y probióticas comparables a la cepa original, por lo que podrían ser tenidos en cuenta para su utilización en alimentos funcionales.

CONCLUSIONES

El presente trabajo de Tesis demostró que es posible aplicar estrategias “naturales” para el mejoramiento de cepas, obteniendo variantes que permiten enfrentar la problemática de las infecciones fágicas en la industria láctea fermentativa. Los mutantes espontáneos aislados y caracterizados exhibieron, en su gran mayoría, muy buenas propiedades tecnológicas, así como niveles muy elevados de fagorresistencia.

Por otro lado, estas variantes probaron ser potenciales probióticos *in vitro*, activando además la respuesta inmune en ratones. Adicionalmente, y como alternativa para resolver la escasa tolerancia de *Lb. delbrueckii* a la bilis, otra estrategia “natural” fue aplicada exitosamente en este trabajo. Es así, que fue posible obtener derivados adaptativos con resistencia mejorada a bilis, a partir de mutantes fagorresistentes de *Lb. delbrueckii*.

Estos cultivos, con fagorresistencia mejorada, óptimas propiedades tecnológicas, biológicas y probióticas, se convierten entonces en excelentes candidatos, no solo para su utilización como cultivos starter, sino como potenciales probióticos a ser incorporados en nuevos alimentos funcionales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ackermann, H. W.; Cantor, E. D.; Jarvis, A. W.; Lembke, J. y Mayo, J. A. (1984). New species definitions in phages of gram positive cocci. *Intervirology* 22, 181-190.
2. Aguirre, M. y Collins, M. D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. A Review. *Journal of Applied Bacteriology* 75(2), 95-107.
3. Akopyanz, N.; Bukanov, N. O.; Westblom, T. U.; Kresovich, S. y Berg, D. E. (1992). DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 20, 5137-5142.
4. Alakomi, H.-L.; Skyttä, E.; Saarela, M.; Mattila-Sandholm, T.; Latva-Kala, K. y Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5), 2001-2005.
5. Alatossava, T.; Forsman, P.; Mikkonen, M.; Räsänen, L. y Vasala, A. (1998). Molecular genetics and evolution of *Lactobacillus* phage and its related phages. *Recent Research Development In Agricultural & Biological Chemistry* 2, 345-359.
6. Allison, G. E. y Klaenhammer, T. R. (1998). Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 8, 207-226.
7. Auad, L.; Ruiz Holgado, A. A. P.; Forsman, P.; Alatossava, T. y Raya, R. R. (1997). Isolation and characterization of a new *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* temperate bacteriophage. *Journal of Dairy Science* 80(11), 2706-2712.
8. Axelsson, L. (1998). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Cap. 1. En *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects*. Ed. por S. Salminen and V. von Wright. 2º Ed.
9. Begley, M.; Gahan, C. G. M. y Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 625-651.
10. Bergonzelli, G. E.; Blum, S.; Brüsow, H., y Corthèsy-Theulaz, I. (2005). Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases? Review. *Digestion* 72, 57-68.
11. Bianchi, M. A.; Del Rio, D.; Sansebastiano, G.; Neviani, E. y Brighenti, F. (2004). A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. *Letters in Applied Microbiology* 39, 301-305.
12. Bibas Bonet, M. E.; de Petrino, S. F.; Mesón, O.; de Budeguer, M. V. y Perdigón, G. (1999). Optimal effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, among other lactobacilli species, on the number of IgA and mast cells associated with

- the mucosa in immunosuppressed mice. *Food and Agricultural Immunology* 11, 259-267.
13. Binetti, A. G. (2001). Bacteriofagos autóctonos de *Streptococcus thermophilus*: aislamiento, caracterización y obtención de mutantes fago-resistentes. Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del grado académico de Doctor en Química.
 14. Binetti, A. G. y Reinheimer, J. A. (2000). Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. *Journal of Food Protection* 63(4), 509-515.
 15. Bolondi, A.; Gaggino, O. y Monesiglio, J. C. (1995). Microscopía electrónica. Técnicas generales. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria ed.
 16. Bottazzi, V. (1998). Vita dei microbi nel formaggio grana. Novara: Mofin s.r.l.
 17. Boucher, I. y Moineau, S. (2001). Phages of *Lactococcus lactis*: An ecological and economical equilibrium. *Recent Researchs and Development of Virology* 3, 243-256.
 18. Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Reviews* 31, 230-314.
 19. Bruttin, A.; Desiere, F.; D'Amico, N. Guérin, J-P.; Sidoti, J.; Huni, B.; Luccini, S. y Brüssow, H. (1997). Molecular ecology of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage infections in a cheese factory. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (8), 3144-3150.
 20. Bude Ugarte, M.; Guglielmotti, D.; Giraffa, G.; Reinheimer, J. y Hynes, E. (2006). Nonstarter lactobacilli isolated from soft and semihard Argentinean cheeses: genetic characterization and resistance to biological barriers. *Journal of Food Protection* 69(12) (en prensa).
 21. Callegari, M. L. (1992). Caratterizzazione dei recettori de pare specifici per l'adesione dei batteri lattici termofili. Tesis presentada para obtener el título de Dottore di Ricerca della Università Católica del Sacro Cuore, Piacenza, Italia.
 22. Capra, M. L.; Quiberoni, A. y Reinheimer, J. A. (2004). Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophages. *Letters in Applied Microbiology* 38, 499-504.
 23. Carminati, D.; Zennaro, R.; Neviani, E. y Giraffa, G. (1993). Selezione e caratteristiche di mutanti fago-resistenti di *Lactobacillus helveticus*. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia* 44(1), 33-48.

24. Cerning, J. (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait* 75, 463-472.
25. Charteris, W. P.; Kelly, P. M.; Morelli, L. y Collins, J. K. (1998). Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology* 51(49), 123-136.
26. Chervaux, C.; Dusko Ehrlich, S. y Maguin, E. (2000). Physiological study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains in a novel chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* 66(12), 5306-5311.
27. Chou, L. S. y Weimer, B. (1999). Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science* 82, 23-31.
28. Chow, J. J.; Batt, C.A. y Sinskey, A. J. (1988). Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* bacteriophage ch2. *Applied and Environmental Microbiology* 54(5), 1138-1142.
29. Church, F. C.; Swaisgood, H. E.; Porter, D. H. y Catignain, G. L. (1983). Spectrophometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science* 66, 1219-1227.
30. Cluzel, P. J.; Veaux, M.; Rousseau, M. y Accolas, J.-P. (1987). Evidence for temperate bacteriophages in two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Dairy Research* 54, 397-405.
31. Cocconcelli, P. S.; Parisi, M. G.; Senini, L. y Bottazzi, V. (1997). Use of RAPD and 16S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey cultures. *Letters in Applied Microbiology* 25, 8-12.
32. Coconnier, M.-H.; Liévin, V.; Bernet-Camard, M.-F.; Hudault, S. y Servin, A. (1997). Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(5), 1046-1052.
33. Coconnier, M.-H.; Liévin, V.; Lorrot, M. y Servin, A. (2000). Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3), 1152-1157.
34. Cogan, T. M. (1996). History and Taxonomy of starter cultures. Cap. 1 en *Dairy Starter Cultures*. Ed. por Cogan y Accolas, J. P.
35. Collado, M. C.; Gueimonde, M.; Hernández, M.; Sanz, Y. y Salminen, S. (2005). Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and

- the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection* 68(12), 2672-2678.
36. Craig, J.; Oberg, C. J. y Broadbent, J. R. (1993.) Thermophilic starter cultures. Another set of problems. *Journal of Dairy Science* 76, 2392-2406.
 37. Curry, B. y Crow, V. (2003). *Lactobacillus* spp. En *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Ed. por Roginski, H.; Fuquay, J. W. y Fox, P. F. Academic Press. Imprint of Elsevier Science. p. 1479-1511.
 38. Davidson, B. E.; Powell, I. B. y Hillier, A. J. (1990). Temperate bacteriophages and lysogeny in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 87, 79-90.
 39. de los Reyes Gavilán, C. G.; Limsowtin, G. K. Y.; Séchaud, L.; Veaux, M. y Accolas, J.-P. (1990). Evidence for a plasmid-linked restriction-modification system in *Lactobacillus helveticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 56(11), 3412-3419.
 40. De Vuyst, L.; De Vin, F.; Vanilgengem, F. y Degeest, B. (2001). Recent development in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from acid lactic bacteria. *International Dairy Journal* 11, 687-707.
 41. del Campo, R.; Bravo, D.; Cantón, R.; Ruiz-Garbajosa, P.; Garcia-Albiach, R.; Montesi-Libois, A.; Yuste, F.-J.; Abraira, V. y Baquero, F. (2005). Scarce evidence of yogurt lactic acid bacteria in human feces after daily yogurt consumption by healthy volunteers. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1), 547-549.
 42. de Moreno de LeBlanc, A. y Perdigón, G. (2004). Yogurt feeding inhibits promotion and progresión of experimental colorectal cancer. *Medical Science Monitoring* 10(4), 96-104.
 43. Desmazeaud, M. (1996). Growth Inhibition of Lactic Acid Bacteria. Cap. 5 en *Dairy Starter Cultures*. Ed. por Cogan, T. M. y Accolas, J. P. VCH Publishers, Inc. p. 135-155.
 44. Djordjevic, G. M.; O'Sullivan, D. J; Walker, S. A.; Conkling, M. A. y Klaenhammer, T. R. (1997). A triggered-suicide system designed as a defense against bacteriophages. *Journal of Bacteriology* 179(21), 6741-6748.
 45. Drake, M. A.; Small, C. L.; Spence, K. D. y Swanson, B. G. (1996). Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. in dairy products by using the polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection* 59, 1031-1036.

46. Dunne, C.; Murphy, L.; Flyin, S.; O'Mahony, L.; O'Halloran, S.; Feeny, M.; Morrissey, D.; Thorton, G.; Fitzgerald, G.; Daly, C.; Kiely, B.; Quigley, E. M. M.; O'Sullivan, G. C.; Shanahan, F. y Collins, K. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 279-292.
47. Earnshaw, R. G. (1992). The Antimicrobial Action of Lactic Acid Bacteria. Natural Food Preservation Systems. Cap. 9 en *The Lactic Acid Bacteria*. Vol. I: The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease. Ed. por Wood, B. J. B. Elsevier Applied Science. p. 211-225.
48. Efstathiou, J. D. y McKay, L. L. (1976). Plasmids in *Streptococcus lactis*: evidence that lactose metabolism and proteinase activity are plasmid linked. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 32(1), 38-44.
49. Fernández, M. F.; Boris, S. y Barbés, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 94, 449-455.
50. Forde, A. y Fitzgerald, G. F. (1999). Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 89-113.
51. Forestier, C.; De Champs, C.; Vatoux, C. y Joly, B. (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology* 152, 167-173.
52. Frank y Hassan. (1998). Starter Cultures and Their Use. Cap. 6 en *Applied Dairy Microbiology*. Ed. por Marth, E.H. and Steele, J.L. Marcel Dekker, Inc. p. 131-172.
53. Galdeano, C. M. y Perdígón, G. (2004). Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *Journal of Applied Microbiology* 97, 673-681.
54. Garrote, G. L.; Abraham, A. G. y De Antoni, G. L. (2000). Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *Journal of Food Protection* 63(3), 364-369.
55. Garvey, P.; van Sinderen, D.; Twomey, D. P.; Hill, C. y Fitzgerald, G. F. (1995). Molecular Genetics of Bacteriophage and Natural Phage Defence Systems in the Genus *Lactococcus*. *International Dairy Journal* 5, 905-947.
56. Gatti, M.; Fornasari, E. y Neviani, E. (1997). Cell-wall protein profiles of dairy thermophilic lactobacilli. *Letters in Applied Microbiology* 25, 345-348.

57. Gatti, M.; Fornasari, M. E. y Neviani, E. (2001). Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* by SDS-PAGE of cell-wall proteins. *Letters in Applied Microbiology* 32, 352-356.
58. Gilliland, S. E.; Nelson, C. R. y Maxwell, C. (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 49(2), 377-381.
59. Giraffa, G. (1998). Population dynamics of thermophilic lactobacilli from whey starter to curd: a model study for Grana cheese. *Med. Fac. Landbouww.Univ. Gent.* 63/4b.
60. Giraffa, G. y Rossetti, L. (2004). Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters* 237, 133-138.
61. Giraffa, G.; De Vecchi, P. y Reinheimer, J. (1997). Population dynamic of thermophilic lactobacilli in mixed strain whey cultures. *Food Research International* 30, 137-140.
62. Giraffa, G.; De Vecchi, P. y Rossetti, L. (1998). Note: identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. *Journal of Applied Microbiology* 85, 918-924.
63. Giraffa, G.; Rossetti, L. y Neviani, E. (2000). An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 42, 175-184.
64. Goldin, B. R. y Gorbach, S. L. (1992). Probiotics, the scientific basis. Cap. Probiotic for humans. (Ed. Fuller, R.) Chapman, & Hall, London. p. 355-376.
65. Greene, J. D. y Klaenhammer, T. R. (1994). Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology* 60(12), 4487-4494.
66. Guarner, F. (2005). Inulin and oligofructose: impact on intestinal diseases and disorders. *British Journal of Nutrition* 93(1), S61-S65.
67. Guarner, F.; Perdígón, G.; Corthier, G.; Salminen, S.; Koletzko, B. y Morelli, L. (2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic? Review. *British Journal of Nutrition* 93, 783-786.
68. Gueimonde, M.; Noriega, L.; Margolles, A.; de los Reyes-Gavilán, C. G. y Salminen, S. (2005). Ability of *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile to adhere to human intestinal mucus. *International Journal of Food Microbiology* 101, 341-346.

69. Guttman, B.; Raya, R. y Kutter, E. (2005). Bacteriophages. Biology and Applications. Cap. Basic Phage Biology. (Ed. por Kutter, E. y Sulakvelidze, A.) CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
70. Hansen, E. B. (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented food of the future. *International Journal of Food Microbiology* 78, 119-131.
71. Heap, H. A. y Harnett, J. T. (2003). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Cap. Bacteriophage in the dairy industry. (Ed. por Roginski, H.; Fuquay, J. W. y Fox, P. F.) Academic Press, Elsevier Science, USA.
72. Hill, C. (1993). Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiology Reviews* 12, 87-108.
73. Hill, C.; Garvey, P. y Fitzgerald, G. F. (1996). Bacteriophage-host interactions and resistance mechanisms, analysis of the conjugative bacteriophage resistance plasmid pNP40. *Lait* 76, 67-79.
74. Hudault, S.; Liévin, V.; Bernet-Camard, M.-F. y Servin, A. L. (1997). Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology* 63(2), 513-518.
75. Huey, B y Hall, J. (1989). Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*. Minisatellite probe from bacteriophage M13. *Bacteriology* 171, 2528-2532.
76. Jarvis, A. W. (1981). The use of whey-derived phage-resistant starter strains in New Zealand cheese plants. *New Zealand Journal of Dairy Science and technology* 51, 25-31.
77. Jarvis, A. W. (1989). Bacteriophages of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 72, 3406-3428.
78. Josephsen, J. y Neve, H. (1998). Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects. Cap. 14: Bacteriophages and Lactic Acid Bacteria. (Ed. por S. Salminen y von Wright) 2º Ed.
79. Kalliomaki, M.; Kirjavainen, P.; Eerola, E.; Kero, P.; Salminen, S. e Isolauri, E. (2001). Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107(1), 129-134.
80. Kimoto, H.; Ohmono, S.; Nomura, M.; Kobayashi, M. y Okamoto, T. (2000). In vitro studies on probiotic properties of lactococci. *Milchwissenschaft*, 55 (5), 245-249.

81. Klaenhammer, T. R. (1984). Interactions of bacteriophages with lactic streptococci. *Advances in Applied Microbiology* 30, 1-29.
82. Klaenhammer, T. R. y Fitzgerald, G. F. (1994). Genetics of Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Cap. 3: Bacteriophages and bacteriophage resistance. (Ed. por Gasson y de Vos), p. 106-158.
83. Klaenhammer, T. R. y Kullen, M. J. (1999). Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 50, 45-57.
84. Lee, Y.-K.; Nomoto, K.; Salminen, S. y Gorbach, S. L. (1999). Handbook of probiotics. Cap. 2: Selection and maintenance of probiotic strains. (John Wiley & Sons, Inc.) Wiley- Interscience Publication, New York, USA. p. 23-32.
85. Lehto, E. M. y Salminen, S. J. (1997). Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* strain GG spent culture supernate: only a pH effect? *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 18, 125-132.
86. Lim, H.-J.; Kim, S.-Y. y Lee, W.-K. (2004). Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. Short Communication. *Journal of Veterinary Science* 5(4), 391-395.
87. Limsowtin, G. K. Y. y Terzaghi, B. E. (1976). Phage resistant mutants: Their selection and use in cheese factories. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 11, 251-266.
88. Limsowtin, G. K. Y.; Broome, M. C. y Powell, I. B. (2003). Encyclopedia of Dairy Sciences. Cap.: Lactic Acid Bacteria, Taxonomy. (Ed. por Roginski, H.; Fuquay, J. W. y Fox, P. F). Academic Press. Imprint of Elsevier Science.
89. Low, D.; Ahlgren, J. A.; Horne, D.; McMahon, D. J.; Oberg, C. J. y Broadbent, J. R. (1998). Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Applied Environmental Microbiology* 49, 115-119.
90. Maillard, J.-Y. (1996). Damage to *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bacteriophage F116 DNA by biocides. *Journal of Applied Bacteriology* 80, 540-544.
91. Makras, L.; Triantafyllou, V.; Fayol-Messaoudi, D.; Adriany, T.; Zoumpopoulou, G.; Tsakalidou, E.; Servin, A. y De Vuyst, L. (2005). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology* 157(3), 241-247.
92. Margolles, A.; García, L.; Sánchez, B.; Gueimonde, M. y de los Reyes-Gavilán, C. G. (2003). Characterization of a *Bifidobacterium* strain with acquired resistance to

- cholate- A preliminary study. *International Journal of Food Microbiology* 82, 191-198.
93. Mäyrä-Mäkinen, A. y Bigret, M. (1998). Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects. Cap. 2: Industrial use and production of lactic acid bacteria. (Ed. por Salminen y V. von Wright). p. 73-102.
 94. McGrath, S.; van Sinderen, D. y Fitzgerald, G. F. (2002). Bacteriophage-derived genetic tools for use in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 12, 3-15.
 95. McKay, L. L. y Baldwin, K. A. (1974). Simultaneous loss of proteinase-and-lactose-utilizing enzyme activities in *Streptococcus lactis* and reversal of loss by transduction. *Journal of Applied Microbiology* 28(3), 342-346.
 96. Mikkonen, M.; Raisanen, L. y Alatossava, T. (1996). The early gene region completes the nucleotide sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* phage LL-H. *Gene* 175(1-2), 49-57.
 97. Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cap.: Assay of β -galactosidase. (Ed. por Miller, J. H.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 352-355.
 98. Minelli, E. B.; Benini, A.; Marzotto, M.; Sbarbati, A.; Ruzzenente, O.; Ferrario, R.; Hendriks, H. y Dellaglio, F. (2004). Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *International Dairy Journal* 14, 723-736.
 99. Moineau, S. (1999). Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 377-382.
 100. Moineau, S. y Lévesque, C. (2005). Bacteriophages: biology and applications. Cap. 10: Control of bacteriophages in industrial fermentations. (Ed. por Kutler, E. y Sulakvelidze, A). CRC Press, Boca Ratón, FL, p. 285-296.
 101. Moineau, S.; Tremblay, D. y Labrie, S. (2002). Phages of lactic acid bacteria: from genomics to industrial applications. *ASM News* 68(8), 388-393.
 102. Morata de Ambrosini, V.; González, S.; de Ruiz Holgado, A. P. y Oliver G. (1998). Study of the morphology of the cell walls of some strains of lactic acid bacteria and related species. *Journal of Food Protection* 61, 557-562.
 103. Moreno de LeBlanc, A. y Perdigón, G. (2004). Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. *Medical Science Monitor* 10(4), 96-104.

-
104. Moser, S. A. y Savage, D. C. (2001). Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology* 67(8), 3476-3480.
 105. Naidu, A. S.; Bidlack, W. R. y Clemens, R. A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38(1), 13-26.
 106. Neve, H. (1996). Dairy Starter Cultures. Cap. 6.: Bacteriophage. (Ed. por T. M. Cogan y J. P. Accolas). VCH Publishers, Inc., p. 157-190.
 107. Neviani, E.; Carminati, D. y Giraffa, G. (1992). Selection of some bacteriophage- and lysozyme-resistant variants of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892. *Journal of Dairy Science* 75, 905-913.
 108. Noriega, L.; de los Reyes-Gavilán, C. G. y Margolles, A. (2005). Acquisition of bile salt resistance promotes antibiotic susceptibility changes in *Bifidobacterium*. Research Note. *Journal of Food Protection* 68(9), 1916-1919.
 109. Noriega, L.; Gueimonde, M.; Sánchez, B.; Margolles, A. y de los Reyes-Gavilán, C. G. (2004). Effect of the adaptation of high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology* 94, 79-86.
 110. Ono, J.; Goto, T. y Okonogi, S. (1992). Functions of Fermented Milk. Cap. 8: Metabolism and Propagation Rates in Lactic Acid Bacteria. (Ed. por Nakazawa y Hosono). Elsevier Applied Science Publishers.
 111. Ouwehand, A. C.; Salminen, S. e Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 279-289.
 112. Ouwehand, A. C.; Tuomola, E. M.; Tolkko, S. y Salminen, S. (2001). Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *International Journal of Food Microbiology* 64(1-2), 119-126.
 113. Ouwehand, A.C. (1998). Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects. Cap. 5: Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. (Ed. por Salminen y V. von Wright).
 114. Pelletier, C.; Bouley, C.; Cayuela, C.; Bouttier, S.; Bourlioux, P. y Bellon-Fontaine, M.-N. (1997). Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1725-1731.

115. Perdigón, G.; de Macías, M. E. y Alvarez, S. (1988a). Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology*, 63, 17-23.
116. Perdigón, G.; Alvarez, S.; Nader de Macías, M. E. y Pesce de Ruiz Holgado, A. A. (1988b). Adjuvant activity of lactic bacteria: perspectives for its use in oral vaccines. *Revista Argentina de Microbiología* 20(3), 141-146.
117. Perdigón, G.; Fuller, R. y Raya, R. (2001). Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Current Issues Intestinal Microbiology* 2 (1), 27-42.
118. Perdigón, G.; Maldonado Galdeano, C.; Valdez, J. C. y Medici, M. (2002). Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *European Journal of Clinical Nutrition* 56(4), 21-26.
119. Perdigón, G.; Maldonado-Galdeano, C.; de Moreno de LeBlanc, A.; Vinderola, G.; Medici, M. y Bibas Bonet, M.E. (2004). Immunomodulation of mucosal immune response by probiotics. *Current Trends in Immunology* 6, 69-85.
120. Perdigón, G.; Nader de Macías, M. E.; Alvarez, S., Oliver, G. y Pesce de Ruiz Holgado, A. A. (1986). Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infection and Immunity* 53(2), 404-410.
121. Perdigón, G.; Vintiñi, E.; Alvarez, S.; Medina, M. y Medici, M. (1998). Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 82, 1108-1114.
122. Pérez, P. F.; Minnaard, Y.; Disalvo, E. A. y De Antoni, G. (1998). Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1), 21-26.
123. Petersen, B. L.; Dave, R. I.; McMahon, D. J.; Oberg, C. J. y Broadbent, J. R. (2000). Influence of capsular and rropy exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* on Mozzarella cheese and cheese whey. *Journal of Dairy Science* 83, 1952-1956.
124. Pillidge, C. J.; Collins, L. J.; Ward, L. J. H.; Cantillon, B. M.; Shaw, B. D.; Timmins, M. J.; Heap, H. A. y Polzin, K. M. (2000). Efficacy of four lactococcal phage resistance plasmids against phage in commercial *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* cheese starter strains. *International Dairy Journal* 10, 617-625.
125. Quiberoni, A.; Guglielmotti, D. M. y Reinheimer, J. A. (2003). Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. *International Journal of Food Microbiology* 84, 51-62.

126. Quiberoni, A.; Reinheimer, J. A. y Tailliez, P. (1998a). Characterization of *Lactobacillus helveticus* by RAPD fingerprints and phenotypic parameters. *Food Research International* 31(8), 537-542.
127. Quiberoni, A.; Reinheimer, J. A. y Suárez, V. B. (1998b). Performance of *Lactobacillus helveticus* spontaneous phage-resistance mutants in hard cheese production. *International Dairy Journal* 8 941-949.
128. Quiberoni, A.; Suárez, V. B. y Reinheimer, J. A. (1999). Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments. *Journal of Food Protection* 62(8), 894-898.
129. Quiberoni, A.; Tailliez, P.; Quénée, P.; Suárez, V. y Reinheimer, J. (1998c). Genetic (RAPD-PCR) and technological diversities among wild *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Applied Microbiology* 85, 591-596.
130. Ravin, V.; Sasaki, T.; Raisanen, L.; Riipinen, K. A. y Alatossava, T. (2006). Effective plasmid pX3 transduction in *Lactobacillus delbrueckii* by bacteriophage LL-H. *Plasmid* (en prensa).
131. Ray, B. y Sandine, W. E. (1992). Food preservatives of microbial origin. Cap.: Acetic, propionic, and lactic acids of starter culture bacteria as biopreservatives. (Ed. por B. Ray y M. Daeschel). CRC Press, Boca Ratón, Fla., p. 103-136.
132. Reinheimer, J. A. (1994). Las bacterias lácticas. Ciencia y Tecnología de los Productos Lácteos. Edit. por CERIDE. Santa Fe, Argentina.
133. Reinheimer, J. A.; Candioti, M. C.; Zalazar, C. A. y Demkow, M. R. (1988). Inhibition of coliforms bacteria by commercial cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 39 (5), 349-366.
134. 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.
135. Reinheimer, J. A.; Suárez, V. B.; Bailo, N. B. y Zalazar, C. A. (1995). Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinian hard-cheese production. *Journal of Food Protection* 58(7), 796-799.
136. Reinheimer, J.; Quiberoni, A.; Tailliez, P.; Binetti, A. y Suárez, V. (1996). The lactic acid microflora of natural whey starters used in Argentina on hard cheese production. *International Dairy Journal* 6, 869-879.

137. Rodtong, S. y Tannock, G. W. (1993). Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3480-3484.
138. Roos, S. y Jonsson, H. (2002). A high-molecular mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology* 148, 433-442.
139. Rossetti, L. y Giraffa, G. (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods* 63(2), 135-144.
140. Roy, D.; Sirois, S. y Vincent, D. (2001). Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Current Microbiology* 42, 282-289.
141. Sainte-Marie, G. (1962). A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 10, 150-156.
142. Salminen, S.; Deighton, M. A.; Benno, Y. y Gorbach, S.L. (1998). Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. Cap.: Lactic acid bacteria in health and disease. (Ed. por Salminen, S. y von Wright, A.). Marcel Dekker, Inc., New York, USA, p. 211-253.
143. Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Vol. 1, 2, 3. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
144. Sánchez, B.; Noriega, L.; Ruas-Madiedo, P.; de los Reyes-Gavilán, C. G. y Margolles, A. (2004). Acquired resistance to bile increases fructosa-6-phosphate phosphoketolase activity in *Bifidobacterium*. *FEMS Microbiology Letters* 235, 35-41.
145. Sanders, M. E. y Klaenhammer, T. R. (1983). Characterization of phage-sensitive mutants from a phage-insensitive strain of *Streptococcus lactis*: evidence for a plasmid determinant that prevents phage adsorption. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 1125-1133.
146. Saxelin, M.; Korpela, R. y Mäyrä-Mäkinen, A. (2003). Dairy processing. Improving quality. Cap.: Functional dairy products. (Ed. por G. Smit). CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA, p. 229-245.
147. Schar-Zammaretti, P. y Ubbink, J. (2003). The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophysical Journal* 85, 4076-4092.

148. Schillinger, U., Guigas, C. y Holzapfel, W. H. (2005). *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal* 12, 1289-1297.
149. Schröder, W.D. (1984) Peracetic acid. *Brauwelt International* 1, 115-120.
150. Sechaud, L.; Callegari, M. L.; Rousseau, M.; Muller, M.C. y Accolas, J.-P. (1989). Relationship between temperate bacteriophage 0241 and virulent bacteriophage 832-B1 of *Lactobacillus helveticus*. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 43:261-278.
151. Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 405-440.
152. Servin, A. L. y Coconnier, M.-H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17(5), 741-754.
153. Sing, W.D. y Klaenhammer, T.R. (1993). A strategy for rotation of different bacteriophage defenses in a lactococcal single-strain starter culture system. *Applied and Environmental Microbiology* 59(2), 365-372.
154. Stendid, J.; Karlsson, J. O. y Hogberg, N. (1994). Intraspecific genetic variation in *Heterobasidium annosum* revealed by amplification of minisatellite DNA. *Mycological Research* 98, 57-63.
155. Stinglele, F.; Nesser, J.-R. y Mollet, B. (1996). Identification and characterization of the eps (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology* 178, 1680-1690.
156. Sturino, J. M. y Klaenhammer, T. R. (2004a). Bacteriophage Defense Systems and Strategies for Lactic Acid Bacteria. Review. *Advances in Applied Microbiology* 56, 331-378.
157. Sturino, J. M. y Klaenhammer, T. R. (2004b). Antisense RNA targeting primase interferes with bacteriophage replication in *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1735-1743.
158. Suárez, V. B. y Reinheimer, J. A. (2002). Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian *Lactococcus lactis* phages. *Journal of Food Protection* 65(11), 1756-1759.
159. Sutherland, I. W. (1972). Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology* 8, 143-212.

-
160. Svensson, U. y Christiansson, A. (1991). Methods for phage monitoring. Bulletin 263, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 29-39.
161. Taranto, M. P.; González de Llano, D.; Rodríguez, A.; Pesce de Ruiz Holgado, A. y Font de Valdez, G. (1996). Bile tolerance and cholesterol reduction by *Enterococcus faecium*, a candidate microorganism for the use as a dietary adjunct in milk products. *Milchwissenschaft* 51, 383-385.
162. Torriani, S.; Zapparoli, G. y Dellaglio, F. (1999). Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4351-4356.
163. Trautwetter, A.; Ritzenthaler, P.; Alatossava, T. y Mata-Gilsinger, M. (1986). Physical and genetic characterization of the genome of *Lactobacillus lactis* bacteriophage LL-H. *Journal of Virology* 59(3), 551-555.
164. Trushina, E. N.; Martynova, E. A.; Nikitiuk, D. B.; Mustafina, O. K. y Baigarin, E. K. (2005). The influence of dietary inulin and oligofructose on the cell-mediated and humoral immunity in rats. *Voprosy Pitaniia* 74(3), 22-27.
165. Tsai, C.-C.; Hsieh, H.-Y.; Chiu, H.-H., Lai, Y.-Y.; Liu, J.-H.; Yu, B. y Tsen, H.-Y. (2005). Antagonist activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. *International Journal of Food Microbiology* 102, 185-194.
166. Tuomola, E. M.; Ouwehand, A. C. y Salminen, S. J. (2000). Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *International Journal of Food Microbiology* 60(1), 75-81.
167. Tuomola, E.; Crittenden, R.; Playne, M.; Isolauri, E. y Salminen, S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73, 393-398.
168. Tuomola, E. y Salminen, S. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology* 41, 45-51.
169. 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. *Journal of Bacteriology* 173(19), 6095-6100.

-
170. Van de Guchte, M.; Ehrlich, S. D. y Maguin, E. (2001). Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Applied Microbiology* 91, 147-153.
171. Van de Water, J. (2003). *Handbook of Fermented Functional Foods*. Cap. 5: Yogur and Inmunity: The health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. (Ed. por Farnworth, E. R). CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA. p 113-144.
172. Vasala, A.; Valkkila, M.; Caldentey, J. y Alatossava, T. (1995). Genetic and biochemical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bacteriophage LL-H lysin. *Applied and Environmental Microbiology* 61(11), 4004-4011.
173. Vauterin, L. y Vauterin, P. (1992). Computer aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *European Microbiology* 1, 37-41.
174. Velraeds, M. M.; Van Der Mei, H. C.; Reid, G. y Busscher, H. J. (1996). Inhibition of inicial adhesión of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1958-1963.
175. Vinderola, C. G. y Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria, a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36, 895-904.
176. Vinderola, C. G.; Médici, M. y Perdigón, G. (2004). Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 96(2), 230-243.
177. Vinderola, G.; Matar, C. y Perdigón, G. (2005). Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by Gram-positive probiotic bacteria: involvement of toll-like receptors. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12(9), 1075-1084.
178. Vintiñi, E.; Alvarez, S.; Medina, M.; Medici, M.; de Budeguer, M. V. y Perdigón, G. (2000). Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell* 24(3), 223-232.
179. Viscardi, M., Capparelli, R., Iannelli, D. (2003). Rapid selection of phage-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus* by immunoselection and cell sorting. *International Journal of Food Microbiology* 89, 223-231.

180. Vizoso Pinto, M. G.; Franz, C. M. A. P.; Schillinger, U. y Holzapfel, W. H. (2006). *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology* 109, 205-214.
181. Walker, D. K. y Gilliland, S. E. (1993). Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science* 76, 956-961
182. Watanabe, K.; Ishibachi, K.; Nakashima, Y. y Sakurai, T. (1984). A phage resistant mutant of *Lactobacillus casei* which permits phage adsorption but not genome injection. *Journal of General Virology* 65, 981-986.
183. Whitehead, H. R. (1953). Bacteriophage in cheese manufacture. *Bacteriological Reviews* 17, 109-123.
184. Whitehead, H. R. y Cox, G. A. (1936). Bacteriophage phenomenon in cultures of lactic streptococci. *Journal of Dairy Research* 7, 55-62.
185. Zourari, A.; Accolas, J. P. y Desmazeaud, M. J. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Lait* 72, 1-34.

ANEXO

ANEXO: MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS. FORMULACIONES.

I. Medios de cultivo

I.1. Medios líquidos

✓ **Caldo MRS**

Se utilizó una versión comercial (Britania, Argentina), pH $6,5 \pm 0,2$.

Composición	g/ l
Proteosa peptona N° 3	10,0
Extracto de carne	8,0
Extracto de levadura	4,0
Glucosa	20,0
Sorbitan monooleato	1,0 ml
Fosfato dipotásico	2,0
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	2,0
Sulfato de magnesio	0,20
Sulfato de manganeso	0,05

Se pesó la cantidad requerida, se disolvió en agua destilada, y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

✓ **Caldo MRS-Calcio**

Caldo MRS esterilizado adicionado de calcio (10 mM). La solución de calcio fue previamente esterilizada por filtración (membranas de diámetro 0,45 µm, Millipore, Francia).

✓ **Caldo MRS-base**

Composición	g/l
Polipeptona	10,0
Extracto de carne	8,0
Extracto de levadura	4,0
Sorbitan monoleato	1,0 ml
Fosfato dipotásico	2,0
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	2,0
Sulfato de magnesio	0,20
Sulfato de manganeso	0,05

Se pesaron los componentes, y se disolvieron en agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

✓ **Caldo MRS-lactosa**

Caldo MRS-base adicionado de lactosa (2%, p/v). Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

✓ **Caldo MRS-glucosa**

Caldo MRS-base estéril adicionado de glucosa (2%, p/v). Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

✓ **Caldo MRS base con agregado de prebióticos**

Caldo MRS-base estéril (autoclave, 121°C, 15 min) adicionado de cada prebiótico (2%, p/v). Las soluciones de prebióticos fueron previamente esterilizadas por filtración (membranas de diámetro 0,45 µm).

✓ **Caldo MRS-bilis**

Caldo MRS estéril adicionado de bilis (0,3; 0,5 y 1% p/v). La solución de bilis fue previamente preparada a partir de la droga sólida disuelta en agua destilada, y esterilizada en autoclave durante 15 min a 121°C.

✓ **Leche descremada reconstituida (LDR)**

Leche descremada en polvo, al 10% en agua destilada. Se esterilizó a 115°C durante 30 min.

✓ **Agua de Peptona (0,1%)**

Se disolvió 1 g de peptona de caseína en 1 litro de agua destilada. Se repartieron 9 ml en tubos. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

✓ **Caldo TS (Tripteína de soya)**

Se utilizó una versión comercial (Britania, Argentina), pH $7,3 \pm 0,2$.

Composición	g/l
Tripteína	17,0
Peptona de soya	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5
Glucosa	2,5

Se pesó la cantidad requerida y se disolvió en agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

✓ **Caldo BHI (Infusión cerebro corazón)**

Se utilizó una versión comercial (Britania, Argentina).

Componente	g/l
Infusión de cerebro	20,0
Infusión de corazón	25,0
Peptona	10,0
Glucosa	2,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato disódico	2,5

Se pesó la cantidad adecuada y se disolvió en agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min. Antes de utilizar, se calentó a ebullición para eliminar el oxígeno disuelto.

✓ **Caldo nutritivo**

Se utilizó una versión comercial (Britania, Argentina), pH 7,3 ± 0,2 (a 25°C).

Componente	g/l
Pluripeptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Cloruro de sodio	8,0

Se pesó la cantidad adecuada y se disolvió en agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

I.2. Medios agarizados

✓ Agar MRS

Caldo MRS adicionado de 12 g/l de agar bacteriológico. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

✓ Agar MRS-Ca-glicina

Agar MRS adicionado de calcio (10 mM) y glicina (1 M). Las soluciones de calcio y de glicina fueron previamente preparadas y esterilizadas por filtración (membranas de diámetro 0,45 µm).

✓ MRS soft-agar (MRS agar blando)

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

✓ Agar nutritivo

Se utilizó una versión comercial (Britania, Argentina), pH $7,3 \pm 0,2$ (a 25°C).

Composición	g/l
Pluripeptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Cloruro de sodio	8,0
Agar	15,0

Se pesó la cantidad adecuada y se disolvió en agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

✓ Agar BHI

Caldo BHI adicionado de 13% g/l de agar bacteriológico. Se disolvió en agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

✓ Agar MacConkey

Se utilizó una versión comercial (Britania, Argentina), pH $7,1 \pm 0,2$ (a 25°C).

Componente	g/l
Peptona	17,0
Lactosa	3,0
Sales biliares	1,5
Cloruro de sodio	5,0
Agar	13,5
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,001

Se pesó la cantidad adecuada y se disolvió en agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

✓ Agar LAPTg

Se utilizó una versión comercial (Britania, Argentina).

Componente	g/l
Peptona de carne	15,0
Tripteína	10,0
Extracto de levadura	10,0
Glucosa	10,0
Tween 80	1,0
Agar	13,0

Se pesó la cantidad adecuada (según especificaciones del fabricante), se disolvió en agua destilada y esterilizó a 121°C durante 15 min.

✓ Agar MRS-sales biliares

Consistió de agar MRS adicionado de las sales biliares (taurocolato y taurodeocolato de sodio, Sigma), de manera tal de alcanzar en el medio una concentración final de 0,5 g% (p/v). Se esterilizó durante 15 min a 121°C.

II. Reactivos de uso general**✓ Solución de NaOH N/9 (solución Dornic)**

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

✓ Biftalato de potasio

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

✓ Solución de cloruro de calcio (1 M)

Se pesaron 110,986 g de cloruro de calcio y se completó a 1 litro con agua bidestilada. Se esterilizó por filtración (Filtros MILLIPORE, tipo HA, 0,45 μm).

✓ Buffer fosfato (0,1 M; pH 6,5)

Se pesaron 18,64 g de fosfato monobásico de potasio y 10,973g de fosfato dibásico de potasio, se disolvió en 1000 ml de agua destilada, se llevó a pH 6,5 y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min.

✓ Buffer fosfato (pH 7)

Se disolvieron 16,08 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (60 mM) y 4,8 g de NaH_2PO_4 (40 mM) en 1000 ml de agua destilada. Se llevó a pH 7 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

✓ **Solución de carbonato de calcio (1 M)** (Cicarelli, Argentina)

Se pesó 105,99 g de carbonato de calcio y se disolvió en un litro de agua destilada. Se esterilizó por filtración (membranas de 0,45 µm de diámetro).

III. Reactivos y buffers utilizados durante la extracción del ADN fágico

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

✓ **Tampón SM:** Tris-HCl (1 M, pH 7,5) 20 ml, Mg₂SO₄ (1 M) 1 ml, NaCl (5 M) 20 ml, gelatina 1 gr, agua destilada hasta 1 lt. Se disolvió la gelatina en 10 ml de agua con calor, y se añadieron los otros componentes.

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

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

IV. Reactivos y buffers utilizados durante la extracción del ADN bacteriano

✓ **Buffer TE_{0,1} (pH 8)**

Se obtuvo mezclando una solución de Tris-HCl (10 mM) y de EDTA (10⁻⁴ M).

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

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

✓ **Mezcla de lisis:**

- Buffer TE_{0,1} pH 8
- DTT (ditiotreitól) 1 M
- EDTA 0,25 M
- SDS 10% (p/v): se preparó a partir de una solución más concentrada.
- Proteinasa K 20 mg/ml

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

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

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

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

✓ **Buffer TAE**

Se mezclaron 40 mM de Tris-acetato y 1 mM de EDTA pH 8, completando el volumen con agua destilada.

V. Enzimas

Se prepararon soluciones madres (Sambrook y col., 1989) a partir de las enzimas liofilizadas comerciales, las cuales se almacenaron a -20°C, constituyendo un stock.

◆ **Proteinasa K** (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA)

Se preparó una solución madre de 10 mg/ ml en agua bidestilada estéril.

◆ **Pepsina 200 µg/ ml** (Merck, Darmstadt, Alemania)

Se pesaron 0,4 mg y se disolvieron en 2 ml de agua bidestilada estéril.

◆ **Lisozima** (Sigma-Aldrich, Alemania)

Se preparó una solución madre de 1000 ppm en agua bidestilada estéril.

VI. Soluciones utilizadas en la caracterización tecnológica de los mutantes fagorresistentes

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

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

✓ **Tetraborato de sodio (borax) (100 mM)** (Sigma-Aldrich, Alemania), PM 201,2

Se pesaron 20,12 g de tetraborato de sodio y se disolvieron en un litro de agua destilada. Se conservó a temperatura ambiente hasta su utilización.

✓ **SDS (lauril sulfato de sodio) 20%** (Sigma-Aldrich, Alemania).

Se pesaron 20 g de SDS y se disolvieron en un litro de agua destilada. Se conservó a temperatura ambiente hasta su utilización.

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

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

✓ **Solución para OPA Test**

Se mezclaron los siguientes componentes:

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

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

✓ **LDR adicionada de hidrolizado de caseína (LDR-HC)**

Se pesó leche descremada reconstituida en polvo (10%) y se adicionó de hidrolizado de caseína (0,25%). Se disolvió en agua destilada. Se esterilizó a 115°C durante 30 min.

✓ LDR adicionada de glucosa (LDR-Glu)

Se preparó leche descremada reconstituida en polvo (10%) como ya fue detallado. Se esterilizó a 115°C durante 30 min. Luego de su esterilización, fue adicionada de glucosa (1%, p/v). La solución de glucosa fue preparada previamente y esterilizada por filtración (membranas de diámetro 0,45 µm).

✓ LDR adicionada de hidrolizado de caseína y glucosa (LDR-HC-Glu)

Se preparó LDR-HC (0,25%) como se detalló anteriormente. Se esterilizó a 115°C durante 30 min. Luego de la esterilización, fue adicionada de glucosa (1%, p/v). La solución de glucosa fue preparada previamente y esterilizada por filtración (membranas de diámetro 0,45 µm).

VII. Soluciones utilizadas en la caracterización biológica y probiótica

✓ Jugo gástrico simulado (pH 2 y pH 3)

Constituido por dos soluciones:

- ◆ Solución de NaCl al 0,5 % esterilizada a 121°C durante 15 min, y
- ◆ Solución de pepsina al 3,0 % esterilizada por filtración (membranas de diámetro 0,45 µm).

La solución final se obtuvo mezclando las soluciones de NaCl y pepsina en relación 9:1. Las soluciones gástricas simuladas se ajustaron a pH 2 o pH 3 adicionando HCl.

✓ Solución de ONPG (Sigma-Aldrich, Alemania)

Se pesaron 40 mg de ONPG (*o*-nitrofenil galactopiranosido) y se disolvieron en 10 ml de agua destilada. Se esterilizó por filtración (membranas de diámetro 0,45 µm).

✓ Buffer PBS (pH 7,4)

Esta solución tampón se preparó mezclando las siguientes sales:

Compuesto	Cantidad (gramos)
NaCl	8,0
KCl	0,2
KH ₂ PO ₄	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,15

Se disolvieron en 1000 ml de agua destilada, y la solución se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C.

VIII. Extracción de proteínas de la pared bacteriana

✓ **Marcador de bajo peso molecular** (Low molecular weight calibration kit para electroforesis SDS) (Pharmacia). Está compuesto por:

Proteína	Peso molecular (Dalton)
Fosforilasa b	94 000
Albúmina	67 000
Ovoalbúmina	43 000
Anhidrasa carbónica	30 000
Inhibidor de Tripsina	20 100
α- lactoalbúmina	14 400