



FAGOS DE *Streptococcus thermophilus* AISLADOS DE YOGUR: VIRULENCIA, DIVERSIDAD GENÉTICA Y RESISTENCIA TÉRMICA

Marangon, Abril

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN – UNL) Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina.

Directora: Guglielmotti, Daniela

Codirectora: Quiberoni, Andrea

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: *Streptococcus thermophilus*, Bacteriófagos, Diversidad fágica

INTRODUCCIÓN

La actividad de los cultivos *starter* en la elaboración de productos lácteos fermentados es esencial para asegurar la calidad del producto final, contribuyendo a la conservación, propiedades organolépticas y valor nutricional del mismo. El desarrollo de las bacterias lácticas (BAL) de estos cultivos puede verse retrasado por diversos factores, entre los que se destacan las infecciones por bacteriófagos (fagos), ya que provocan consecuencias muy severas para el sector productivo (Pujato y col., 2019). La elaboración de yogur se basa en la actividad del *starter* primario, compuesto por *Streptococcus thermophilus* (especie predominante) y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Con el objetivo de enfrentar racionalmente la problemática, algunas empresas lácteas han sumado protocolos de monitoreo fágico en zonas críticas del proceso, así como en materia prima e insumos. Para que el diseño de estos protocolos sea apropiado es indispensable conocer las características de los fagos detectados y aislados. Esto incluye virulencia (perfil de cepas hospedadoras), tipificación fágica (perfil de restricción de ADN y agrupamiento por similitud genética (McDonnell y col., 2017) y resistencia a los tratamientos térmicos aplicados durante las elaboraciones. Además, se sabe que la capacidad evolutiva de estos fagos es muy grande, por lo que estudiar su ecología (diversidad y evolución) en los ambientes de procesamiento podría facilitar la selección de las nuevas alternativas tecnológicas a proponer.

Título del proyecto: BACTERIÓFAGOS EN DERIVADOS DE LACTOSUERO: ESTRATEGIAS PARA ENFRENTAR LA PROBLEMÁTICA EN EL SECTOR PRODUCTIVO
Instrumento: PICT
Año convocatoria: 2019
Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)
Director/a: Quiberoni, Andrea



OBJETIVOS

- Determinar la virulencia de los fagos aislados frente a cepas comerciales de *Streptococcus thermophilus*.
- Caracterizar genéticamente los fagos de *S. thermophilus* aislados.
- Analizar frecuencia y permanencia de los fagos en la planta.
- Estudiar la resistencia térmica de los fagos.

METODOLOGÍA

Se estudiaron 25 fagos de *S. thermophilus* aislados en el INLAIN entre 2002 y 2017, a partir de producciones de yogur de una importante industria láctea. Las cepas de *S. thermophilus* se aislaron de fermentos comerciales usados en las mismas elaboraciones que permitieron el aislamiento de los fagos (Tabla 1). A continuación, se describen los ensayos realizados:

Perfil de hospedadores

El espectro de cepas sensibles y resistentes para cada fago se determinó enfrentando todas las cepas comerciales a cada uno de los fagos, mediante Test de Turbidez (medio líquido) y Spot Test (medio agarizado) (Svensson y Christiansson, 1991).

Diversidad genética

Perfil de restricción: el ADN de los fagos se extrajo, purificó y sometió a restricción con endonucleasas (HindIII, EcoRI y EcoRV, Sigma) según Sambrook y Russell (2001). Los fragmentos obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa (0,8 % p/v) en buffer TAE 1X, adicionando GelRed como colorante de tinción de ácidos nucleicos (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA), y se visualizó bajo luz UV.

Determinación de grupos fágicos: actualmente, los fagos de *S. thermophilus* se clasifican en cinco grupos (*cos*, *pac*, 5093, 987 y P738) según su similitud en distintas regiones de su genoma. A excepción de grupo P738 incorporado recientemente (Philippe y col., 2020), se verificó la pertenencia de los fagos aislados a alguno de los restantes grupos, aplicando una metodología PCR multiplex, utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos para cada uno los grupos (Lavelle y col., 2018).

Persistencia de los fagos en el ambiente industrial

El análisis de los perfiles de restricción permitió agrupar los fagos de acuerdo a su similitud genética. Este dato se utilizó para analizar la frecuencia de aislamiento de cada grupo fágico durante los 15 años de monitoreo (2002 - 2017) en la planta elaboradora de yogur.

Resistencia térmica de los fagos

Un representante de cada grupo fágico fue sometido a un tratamiento térmico a 72 °C (temperatura de pasteurización HTST - High Temperature/Short Time), utilizando caldo de cultivo (M17) y leche descremada reconstituida estéril (LDR, 10% p/v) como medios de suspensión. Como control, se usaron suspensiones de los fagos mantenidos a temperatura ambiente. A intervalos de tiempo determinados (entre 0 y 45 min), se titularon (UFP/ml) las suspensiones (tratadas y no tratadas) y se calculó la inactivación en el tiempo de incubación testeado.

Tabla 1: Fagos líticos de *Streptococcus thermophilus* estudiados: agrupación según perfil de restricción, grupos genéticos y cepas indicadoras usadas.

Grupo según restricción ^a	Fago	Grupo genético ^b	Cepa indicadora ^c
1	XII-1	<i>cos</i>	XII-1
	XII-2	<i>cos</i>	XII
	XII-3b	<i>cos</i>	XII
	XII-4	<i>cos</i>	XII
	XII-5	<i>cos</i>	XII
2	XII-DG1	<i>cos</i>	XII
3	XII-DM2	<i>cos</i>	XII
	XII-3a	<i>cos</i>	XII-1
	XII-DM1	<i>cos</i>	XII
	XII-DM3	<i>cos</i>	XII
	XII-DM4	<i>cos</i>	XII
4	YXCII-1	<i>cos</i>	YXCII-1
5	016-1	<i>pac</i>	016-1
6	ST1-2C	<i>pac</i>	Mild 2C
	M2C-11F	<i>pac</i>	Mild 2C
	ST2-2C	<i>pac</i>	Mild 2C
	ST3-2C	<i>pac</i>	Mild 2C
7	T7M2	<i>cos</i>	Tan 7
	XII-DG2	<i>cos</i>	Tan 7
	T7M3	<i>cos</i>	Tan 7
	T7M4	<i>cos</i>	Tan 7
8	016-DG1	<i>pac</i>	016-1
	016-DG2	<i>pac</i>	016-1
9	YXCII-2	<i>pac</i>	YXCII-2
10	ALQ-A	<i>pac</i>	ALQ

^a: Usando las enzimas HindIII, EcoRI y EcoRV; ^b: Aplicando PCR multiplex para los grupos fágicos *cos*, *pac*, 5093 y 987; ^c: Cepa comercial de *S. thermophilus* usada durante el aislamiento de cada fago.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El perfil de hospedadores reveló que estos fagos son capaces de infectar entre 2 y 5 de las 8 cepas comerciales analizadas. Por su parte, 3 de las 8 cepas son infectadas por 24 de los 25 fagos, demostrando una gran sensibilidad fágica. El análisis de los perfiles de restricción (HindIII, EcoRV y EcoRI), permitió clasificarlos en 10 grupos. Además, tres grupos fágicos fueron aislados en repetidas ocasiones en el transcurso de varios años (entre 2 y 9 años), indicando una elevada persistencia en el ambiente de elaboración (Figura 1).

La PCR multiplex aplicada permitió clasificar los fagos en dos grupos genéticos, perteneciendo 16 fagos al grupo *cos* (Moineuvirus) y 9 al grupo *pac* (Brussowvirus). No se encontró ningún fago perteneciente a alguno de los tres grupos recientemente incorporados (5093, 987 y P738).

En general, se recuperaron partículas virales incluso luego de 45 min de tratamiento térmico, demostrando que no fue posible la inactivación total de la población fágica. Además, se observó un efecto protector de la leche, ya que los recuentos fueron mayores en este medio de suspensión en comparación con el caldo de cultivo.

Estos resultados permiten analizar la diversidad y evolución ecológica de fagos de *S. thermophilus* en el ambiente industrial, y también modificar/diseñar, con herramientas apropiadas, diversas estrategias de sanitización de materias primas e insumos usados en la planta elaboradora.

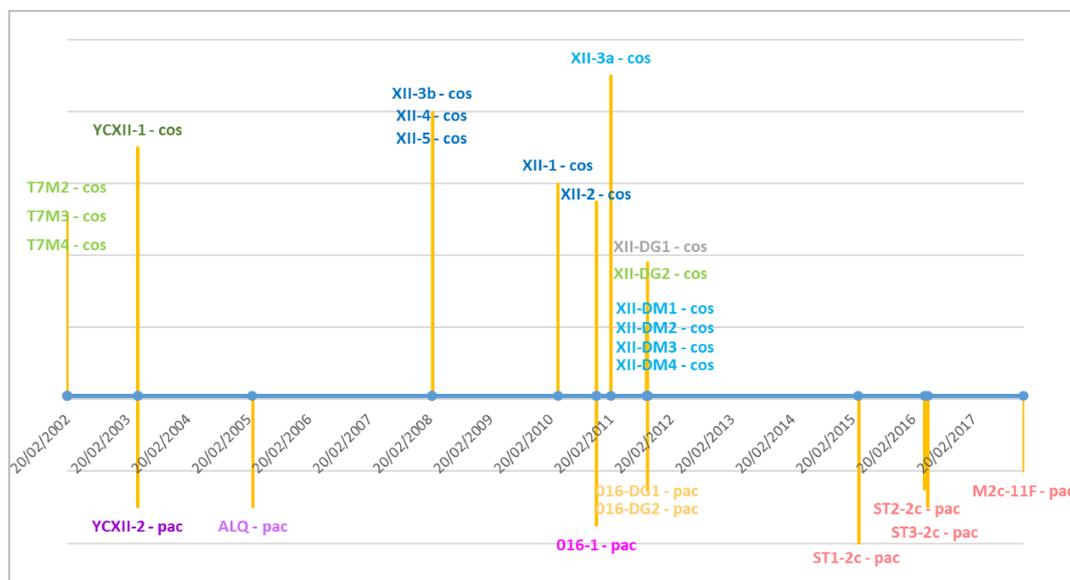


Figura 1: Línea de tiempo correspondiente al aislamiento de los fagos, entre 2002 y 2017. Los fagos pertenecientes al mismo grupo fágico (10 grupos, obtenidos de acuerdo a los perfiles de restricción) están indicados con un mismo color. Asimismo, se indica el grupo genético obtenido para cada fago.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Lavelle, D., Martinez, I., Neve, H., Lugli, G.A., Franz, C.M.A.P., Ventura, M., dal Bello, F., van Sinderen, D., Mahony, J., 2018. Biodiversity of *Streptococcus thermophilus* phages in global dairy fermentations. *Viruses* 10, 577.
- McDonnell, B., Mahony, J., Hanemaaijer, L., Neve, H., Noben, J.-P., Lugli, G.A., Ventura, M., Kouwen, T.R., van Sinderen, D., 2017. Global survey and genome exploration of bacteriophages infecting the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Front. Microbiol.* 8, 1754.
- Philippe, C., Levesque, S., Dion, M.B., Tremblay, D.M., Horvath, P., Lüth, N., Cambillau, C., Franz, C., Neve, H., Fremaux, C., Heller, K.J., Moineau, S., 2020. Novel genus of phages infecting *Streptococcus thermophilus*: Genomic and morphological characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e00227-20.
- Pujato, S.A., Quiberoni, A., Mercanti, D.J., 2019. Bacteriophages on dairy foods. *J. Appl. Microbiol.* 126, 14–30.
- Sambrook, J., Russell, R.W., 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Svensson, U., Christiansson, A., 1991. Methods for phage monitoring. Bulletin 263, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 29–39.