

T-375

BEOLETTO, U. G.
Estudio del Estado L



60653

2003

60653

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO QUÍMICAS Y
NATURALES



CREER...CREAR...CRECER

*Estudio del estado lisogénico de bacterias
ácido lácticas regionales. Caracterización
parcial de sus bacteriófagos temperados.*

Por

Licenciada Viviana Graciela Beoletto

TESIS PARA OPTAR AL TITULO
MAGISTER EN BIOTECNOLOGIA
RIO CUARTO, 2003.



00003

Faint, illegible text in the upper middle section of the page.



Lic. Viviana Beoletto
TESISTA

:Dr. Raúl Ricardo Raya
DIRECTOR

Dr. Alberto Eraso
CODIRECTOR

TRIBUNAL:

Dra. Graciela Font

Dra. Rosa Nagel

Dra. Lilitiana Odierno

82000

60653

MFN:
Clasif:
T.375

A Fabián

A Marco y Agustina

A mis padres

Agradecimientos

-A mi director de Tesis, *Dr. Raúl Raya*, quien me abrió las puertas de CERELA, donde pude desarrollar parte del trabajo experimental de mi Tesis, quien también me alentó a realizar este trabajo. Él es para mí un ejemplo de profesionalismo, trabajo, eficiencia, inteligencia y amabilidad. Bajo su dirección recibí su apoyo y, aunque a veces nos condicionaba la distancia, supo sortear esa dificultad y me ayudó a resolver las dificultades que se presentaban. A él le estoy profundamente agradecida.

-A mi codirector de Tesis, *Dr. Alberto Eraso*, quien generosamente me abrió las puertas de su grupo de Investigación para desarrollar este trabajo. Por la confianza que depositó en mí y su apoyo incondicional.

-A la gente de CERELA, por su brindarme su apoyo científico y moral, así como también la amabilidad propia de los tucumanos.

-A la *Dra. Mónica Finola*, por su amistad, aliento y útiles consejos.

-A mis amigas y compañeras: *Mirta y Claudia*, por todos los momentos que compartimos juntas y el apoyo que me brindaron.

-A la *Dra. Lilita Odierno*, por su amistad y sus valiosos aportes y críticas a mi trabajo.

-A la *Universidad Nacional de Río Cuarto*, por haberme brindado la posibilidad de realizar esta Tesis.

-A *mis padres*, por la educación que me brindaron, por sus constantes estímulos y por inculcarme con su ejemplo, responsabilidad y perseverancia en el trabajo.

-A *Fabián, Marco y Agustina*, por su amor, comprensión y paciencia.

INDICE

	<i>página</i>
RESUMEN	6
A. INTRODUCCION	
A.1. Las bacterias lácticas	8
A.2. Las bacterias lácticas en la industria láctea	11
A.3. Bacteriófagos. Generalidades	12
A.4. Morfología y caracterización de fagos	15
A.5. Clasificación actual de fagos	17
A.6. Bacteriófagos en la Industria lactocasearia	26
A.7. Lisogenia y fagos temperados en bacterias lácticas	28
A.8. Pseudolisogenia	29
A.9. Genoma de los bacteriófagos de LAB	30
A.10. Organización modular	30
A.11. Mecanismos de resistencia a fagos	32
A.11.1 Bloqueo de la adsorción	33
A.11.2. Bloqueo de penetración del ADN	33
A.11.3. Sistema Restricción/Modificación	34
A.11.4. Infección abortiva (ABI)	35
A.11.5. Inmunidad por lisogenia	35
A.12. Caracterización de los fagos	36
A.12.1. Rango de huéspedes	36
A.12.2. Morfología	36
A.12.3. Perfil proteico	37
A.12.4. Serología	37
A.12.5. Test de neutralización	38
A.12.6. Western blot	38
A.12.7. ELISA	38
A.12.8. Microscopía inmuno-electrónica	39
A.12.9. Biología molecular de fagos	39

A.12.9.1. Análisis de enzimas de restricción	39
A.12.9.2. Determinación de mapas de restricción	39
A.12.9.3. Tamaño genómico	40
A.12.9.4. Hibridización ADN/ ADN	40
A.13. La industria lactocasearia en Argentina	41
A.14. Enterococos en la industria lactocasearia.	41
B. OBJETIVOS	45
C. MATERIALES Y METODOS	
C.1. Medios de Cultivo, reactivos y Soluciones	48
C.2. Métodos de trabajo	51
D.RESULTADOS Y DISCUSION	
D.1. Aislamiento y caracterización de bacterias lácticas	66
D.2. Estudio del estado lisogénico de los aislamientos	66
D.3. Inducción de los mismos con mitomicina C	67
D.4. Identificación taxonómica	74
D.5. Secuencias editadas de los fragmentos amplificados	75
D.6. Microscopía electrónica de las células huésped y de los fagos	78
D.7. Caracterización parcial de los bacteriófagos aislados	82
D.8. Detección de cepas indicadoras por el método de la gota	84
D.9. Microscopía electrónica de los fagos	84
E.CONCLUSION Y PROYECCIONES	86
F.BIBLIOGRAFIA	89
FIGURAS	
Figura 1. Diferentes tipos morfológicos de los bacteriófagos	18
Figura 2. Ciclos lítico y lisogénico de los bacteriófagos	22
Figura 3. Esquema de organización modular	32
Figura 4. Inducción a lisis con MC en las cepas control y 12Q3	68
Figura 5. Inducción a lisis con MC en las cepas control y K3	69

Figura 6. Cinética de crecimiento de la cepa 12Q3 (A) y K3 (B) posterior a la adición de MC (0,15-1 ug/ml)	69
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del ADN de las cepas 12Q3 y K3	75
Figura 8. Secuencia de bases de la región variable V1 del ADNr 16S de la cepa 12Q3	76
Figura 9. Secuencia de bases de la región variable V1 del ADNr 16S de la cepa K3	77
Figura 10. Microscopía electrónica de transmisión de células de la cepa 12Q3 en cultivo sin inducción con MC	79
Figura 11. Microscopía electrónica de transmisión de células no lisadas (oscuras) y lisadas (claras) de la cepa 12Q3 de un cultivo adicionado con MC	80
Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión de células septadas de la cepa 12Q3 de cultivo adicionado con MC a mayor magnificación	81
Figura 13. Perfiles de restricción del ADN de los fagos aislados de las cepas 12Q3 y K3 por corte con enzimas de restricción en gel de agarosa	82
TABLAS	
Tabla 1: Diferenciación entre géneros de bacterias lácticas de importancia en la industria alimentaria fermentativa.	11
Tabla 2: Clasificación en familias de los fagos polihédricos, filamentosos y pleomórficos.	21
Tabla 3: Características fisiológicas y pruebas metabólicas determinadas en las cepas 12Q3 y K3	72
Tabla 4: Perfil fermentativo de azúcares de las cepas 12Q3 y K3.	73
Tabla 5. Peso molecular (kb) aproximado en kilobases de los fragmentos de ADN de los fagos ϕ 12Q y ϕ K3 por corte con enzimas de restricción en gel de agarosa	82

RESUMEN

Se ha evaluado, mediante el uso de mitomicina C, el estado lisogénico de 91 cepas de bacterias ácido-lácticas, aisladas en la Universidad Nacional de Río Cuarto a partir de productos lácteos regionales como quesos pasta dura y blanda, suero fermento y leche cruda. La inducción del ciclo lítico se logró en 2 de las cepas aisladas (2%).

Las 2 cepas fueron identificadas por métodos convencionales (análisis por pruebas metabólicas) y no convencionales (análisis por PCR del DNA que corresponde al 16S RNAr y luego secuenciamiento). Se las ubicó en el género *Enterococcus* por la primera metodología, siendo este género muy común en los productos lácteos regionales. El estudio de las secuencias de estas cepas en el banco de datos confirmó la ubicación en este género.

Las micrografías electrónicas de las células mostraron el grado de lisis de las mismas.

Los 2 fagos temperados aislados que fueron designados como ϕ 12Q3 y ϕ K3, fueron caracterizados parcialmente: se determinó el peso molecular de ambas partículas, se buscó el rango de huéspedes y se intentó fotografiar en microscopio electrónico.

Los fagos del género *Enterococcus* no han sido muy estudiados y en este trabajo se han caracterizado 2 nuevas partículas fágicas.

A. I N T R O D U C C I Ó N

A. Introducción

A.1. Las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas, o bacterias ácido-lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos que participan en un gran número de fermentaciones espontáneas de alimentos. A través de los tiempos, el hombre ha hecho uso de estos procesos fermentativos naturales para preservar los alimentos, garantizando una vida prolongada de los mismos. Los productos lácteos fermentados (queso, yogur, manteca) han sido ya mencionados en antiguos textos Mesopotámicos y en la Biblia. Hay referencias en textos arcaicos de Uruk/ Warka (Iraq), que datan del año 3200 A.C.

El bajo pH generado por el ácido y la acción de otros productos de fermentación, inhiben el crecimiento de muchas bacterias patógenas y de otras que alteran el alimento. Las fermentaciones lácticas son usadas para fabricar queso, yogurt y una amplia variedad de productos lácteos fermentados de la leche, para elaborar salames a partir de carnes y pickles a partir de vegetales, etc. (Mc Kay ,1990)

En el presente, algunas cervezas de sorgo, maíz y mijo se obtienen por fermentación láctica. Esto juega un rol decisivo en la seguridad y aceptabilidad de estos productos en los climas tropicales (Haggblade y Holzapfel,1989). Algunos fabricantes usan la tecnología tradicional en el procesamiento de quesos y productos cárneos fermentados.

El concepto de bacterias lácticas como responsables de las *fermentaciones naturales*, se comenzó a utilizar en los albores de 1900. Las interacciones de las BAL en alimentos llamaron la atención de científicos y Pasteur contribuyó grandemente con la descripción de la fermentación ácido-láctica en 1857.

Joseph Lister en 1873 aisló la primera cepa bacteriana pura, *Bacterium lactis*, a partir de leche agria. Esta bacteria fue luego denominada *Streptococcus lactis* por Orla Jensen y actualmente es *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

El uso de las BAL como *iniciadores de fermentación* (starters) para la producción de quesos y leche fermentada, fue adoptado mucho antes que emergiera la bacteriología como un campo de estudio, en 1890 por Weigmann en Kiel y, casi simultáneamente por Storch en Copenhagen. Esto abrió el camino para la industrialización de alimentos fermentados.

El habitat de estas bacterias es diverso. Dominan la microflora natural en leches, carnes, vegetales y cereales. Además, forman parte de la flora normal de la cavidad oral, intestino, colon y vagina en la especie humana. En este ambiente, previenen la colonización de las mucosas por microorganismos patógenos. Por ésto algunas de ellas son consideradas *probióticos* o promotores de la salud humana y animal.

Las primeras definiciones de las BAL como grupo se basaron en la habilidad para fermentar y coagular la leche. Este grupo incluía bacterias coliformes y bacterias lácticas. La descripción de *Lactobacillus* por Beijerinck en 1901 como una bacteria Gram positiva, separó los coliformes de las BAL.

Actualmente el término BAL se usa para describir un grupo de bacterias Gram positivas, cocos o bacilos, no esporuladas, usualmente no móviles, que utilizan carbohidratos fermentables y forman ácido láctico como producto final mayoritario, son tolerantes al ácido, catalasa negativa, preferentes de un ambiente anaerobio e incapaces de reducir los nitratos. Su metabolismo es estrictamente fermentativo y poseen requerimientos nutricionales complejos que incluyen carbohidratos, aminoácidos, péptidos, ésteres de ácidos grasos, sales derivados de ácidos nucleicos y vitaminas. (Quiberoni A, 1997).

Están representadas por los siguientes grupos:

Cocos: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Weissella*.

Bacilos: *Lactobacillus*, *Carnobacterium*.

Según los productos obtenidos en la fermentación de los monosacáridos, pueden separarse en dos grupos:

Bacterias lácticas homofermentativas, que convierten la glucosa prácticamente en una sola sustancia, el ácido láctico, y las *heterofermentativas*, que producen una mezcla de productos (ácido láctico, dióxido de carbono y ácido acético o ácido láctico, dióxido de carbono y etanol).

Es importante destacar que al hablar de carácter homofermentativo y heterofermentativo en bacterias lácticas, se hace referencia a la glucosa como carbohidrato fermentable. Pueden presentarse otros comportamientos frente a otros carbohidratos (algunos lactobacilos son homofermentativos frente a las hexosas y heterofermentativos para las pentosas, denominándose *heterofermentativos facultativos*. Otros son heterofermentativos para ambas, denominándose *heterofermentativos obligados*.

Las bacterias lácticas utilizadas en la industria alimentaria fermentativa pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*.

En la Tabla 1 pueden observarse algunas características de los géneros mencionados.

Tabla 1: Diferenciación entre géneros de bacterias lácticas de importancia en la industria alimentaria fermentativa.

GENERO	MORFOLOGIA CELULAR	FERMENTACION
Lactococcus	Cocos en cadena	Homofermentadores
Streptococcus	Cocos en cadena	Homofermentadores
Leuconostoc	Cocos en cadena	Heterofermentadores
Pediococcus	Cocos en tétradas	Homofermentadores
Lactobacillus	Bacilos generalmente en cadenas	-Homofermentadores obligados. -Heterofermentadores facultativos. -Heterofermentadores obligados.

A.2. Las bacterias lácticas en la industria láctea

Los géneros mencionados en la tabla 1 pueden ser empleados como agentes de transformación de la materia prima (leche) en alimentos fermentados. Los fermentos lácticos usados en esta industria, contienen cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*, ya que las bacterias del género *Pediococcus* utilizan dificultosamente la lactosa de la leche como fuente de carbono y, por lo tanto, su potencial como agente de fermentación es despreciable. Sin embargo, su función es decisiva en la obtención de productos cárneos fermentados.

Las BAL cumplen un rol fundamental en el proceso de fabricación de quesos y leches fermentadas (yogur, leche cultivada, etc.). Por la fermentación de la lactosa presente en la leche, estos microorganismos producen gran cantidad de ácido láctico, lo que se traduce en una disminución del pH, que deriva en importantes aplicaciones prácticas. Una de ellas es contribuir a la precipitación de la caseína durante la elaboración quesera.

La acidificación por parte de las BAL permite además, la inhibición de microorganismos indeseables, no sólo a través de la producción de ácido láctico, sino también de otros productos como bacteriocinas, antibióticos, peróxido de hidrógeno, etc.

A.3. Bacteriófagos. Generalidades

Se denominan *bacteriófagos*, o *fagos*, a los virus que infectan bacterias. Su descubrimiento tuvo lugar en Londres en el año 1915 por F.W.Twort. En 1917, F.H. d'Hérelle introdujo la palabra bacteriófago derivada del griego *phage*, que significa "comer". Por ese entonces, d'Hérelle creía que existía una sola especie de fagos dotada de una gran capacidad de adaptación (Ackermann y DuBow, 1987).

D'Herelle no tuvo ninguna duda respecto a la naturaleza vírica del fenómeno y además vislumbró la posibilidad de utilizar a los fagos para el tratamiento de las enfermedades bacterianas del hombre y animales (Douglas, 1978). Aunque encontró fagos contra muchas bacterias, creyó que era sólo un bacteriófago con muchas variedades.

Durante la década de los veinte se conocieron la mayoría de las propiedades de los bacteriófagos. Se comprobó que los bacteriófagos tenían un espectro muy limitado de bacterias huéspedes susceptibles de ser infectadas y lisarse. Normalmente, las bacterias huéspedes de un fago concreto son variantes muy relacionadas con una especie. Generalmente, cada cepa bacteriana es

susceptible de ser infectada por un grupo de fagos, aunque éstos puedan diferir ampliamente entre ellos respecto a otras características.

En la década de los cuarenta se produjeron dos acontecimientos que renovaron el ímpetu y enfoque de la biología de los fagos. En primer lugar, el desarrollo del microscopio electrónico proporcionó la posibilidad de que las partículas fágicas pudieran observarse claramente delimitadas, confirmando así su naturaleza particulada y develando en parte su diversidad de forma y tamaño. En segundo lugar, mientras que los primeros investigadores habían trabajado de forma aislada y con fagos diversos, en los EE.UU. un grupo concentró sus esfuerzos en el estudio de un conjunto particular de fagos de *Escherichia coli*, concretamente los denominados "fagos T".

Los años cincuenta podrían denominarse la "década dorada de la biología de fagos". Los estudios con los fagos tienen un papel protagonista en el descubrimiento del ADN como el *depositario primario de la información genética, y sobre todo en la comprensión del código genético*. Aunque con una significación menor, los fagos proporcionan un modelo de comportamiento para la comprensión de los virus implicados en las enfermedades humanas. A través de los años sesenta y hasta el presente, los fagos han constituido un material ideal para la investigación de los mecanismos genéticos a nivel molecular.

Los bacteriófagos *son los organismos más abundantes en la biosfera* y juegan los roles mayores en el balance ecológico de la vida microbiana. Las secuencias genómicas de diez fagos de micobacterias recientemente aislados sugieren que la población de bacteriófagos *es muy diversa y puede representar el reservorio más grande e inexplorado de secuencias de información en la biosfera*. La *comparación genómica* de estos fagos contribuye a comprender los mecanismos de la evolución viral y provee evidencia del rol de la *recombinación ilegítima en el intercambio genético horizontal*. La promiscuidad de estos eventos de recombinación resultan en la inclusión de muchos genes, incluyendo algunos implicados en la respuesta inmune a la infección por micobacterias y las

enfermedades autoinmunes como el lupus humano. Además, son vehículos de genes de toxinas. (Padulla ML, Hendrix RW, 2003).

Estas observaciones sugieren un papel mucho mayor de los fagos en *la virulencia bacteriana y la respuesta del huésped a la infección bacteriana*.

Los estudios realizados usando como modelo a los fagos revolucionaron la biología y establecieron el campo de la biología molecular (Cairns, 1992). Son muy abundantes en el medio ambiente.

Hay aproximadamente 10^{31} fagos en la biosfera, lo que los sitúa en las entidades biológicas más abundantes del planeta (Rohwer, 2002). Además, hay aproximadamente 10^{10} fagos/litro de agua de mar superficial (Bergh, 1989) y de 10^7 a 10^9 /gramo de sedimento en la superficie del suelo (Danovaro, 2000; Danovaro, 2001; Hewson, 2001). En el océano, son los mayores predadores de bacterias y conductores de intercambio genético, transduciendo aproximadamente 10^{25} a 10^{28} pares de bases de DNA por año (Jiang, 1998; Paul, 1999).

Como cualquier virus, los fagos se reproducen parasíticamente en sus huéspedes bacterianos, resultando en una progenie de nuevas partículas de fagos que son liberadas en el medio ambiente luego de la lisis de las células bacterianas. Esto lo hacen desviando el metabolismo de la bacteria hacia la síntesis de nuevas partículas fágicas.

El gran atractivo de los fagos reside en que, aparte de reproducirse, apenas realizan otras funciones. El genoma fágico, al no mantener un complejo sistema vital, que se verifica a expensas de la célula huésped, puede alcanzar hasta la mitad del peso total de la partícula. A consecuencia de ello, apenas existen dificultades que impidan las investigaciones dirigidas directamente al genoma. En el mismo sentido, su genotipo limitado facilita el control de aspectos específicos adecuados para su estudio. El genotipo y fenotipo pueden relacionarse de una manera que resulta impracticable para los sistemas celulares. Por otra parte, los *huéspedes bacterianos* se pueden mantener perfectamente *in vitro* bajo unas condiciones controladas que exigen una dedicación, un tiempo y un espacio relativamente escasos respecto a vegetales y animales.

Por lo tanto, los fagos son *parásitos a nivel genético* y pueden ser comparados a piratas que invaden y toman el control total de un barco (Bresch y Hausmann, 1970).

A.4. Morfología y caracterización de fagos

Las partículas virales muestran una enorme variedad de formas y dimensiones. Algunas son helicoidales, otras son casi esféricas y otras son una combinación de estructura esférica y helicoidal. Los virus que poseen una estructura helicoidal resultan de la asociación de muchas subunidades proteicas iguales, agrupadas en torno a una molécula simple de ácido nucleico, llamada cromosoma viral, que puede ocupar el centro o "corazón" de la estructura.

Las subunidades proteicas de la hélice se llaman capsómeros. Algunos virus bacterianos (bacteriófagos) son complejos, estando constituidos por una estructura poliédrica (llamada cabeza) conectada a una estructura helicoidal (llamada cola). Esta combinación llamada "binaria", es relativamente común entre los fagos. En este caso, el ácido nucleico está siempre localizado en la cabeza, y la cola sirve de órgano de unión a la célula hospedadora.

Desde el punto de vista químico, los bacteriófagos tienen una composición muy simple, estando formados casi exclusivamente por *proteínas y ácido nucleico*, y algunos cationes inorgánicos en cantidades muy reducidas. Los fagos contienen un solo tipo de ácido nucleico que para los de bacterias lácticas, es siempre ADN de doble cadena. El ADN aparece fuertemente empaquetado en la envoltura proteica de la cabeza (cápside), la cual es resistente a la acción de las proteasas (Bradley, D.E. 1967).

A pesar de su gran número y presencia ubicua, se conoce muy poco sobre su biodiversidad, biogeografía o filogenia.

Históricamente, los fagos han sido caracterizados por su *rango de huéspedes y las características físicas de los viriones libres*, incluyendo tamaño de

cápside, forma, resistencia a solventes orgánicos y estructura, así como también el tamaño y tipo genómico.

La información está limitada, en parte, por el sistema taxonómico ICTV, que está basado en el cultivo de fagos y la medida de los parámetros físicos de los viriones libres. El ICTV clasifica a los virus en taxones (órdenes, familias y géneros). Las raíces de los nombres de estos taxones están en idioma latín o griego y su terminación es: *virales*, *-viridae*, y *-virus*, respectivamente. Estos nombres generalmente reflejan propiedades características. La mayoría de los géneros de fagos poliédricos, filamentosos y pleomórficos tienen nombres latinizados.

Rohwer (Rohwer,2002) propuso un *árbol proteómico* basado en la información genética para ser usado como sistema taxonómico para los fagos. Dicho sistema no aportó un gran mejoramiento a la clasificación viral.

El concepto de *Clasificación Modular* deriva de la teoría de la evolución modular de Susskind y Botstein (1978) y dio origen a una serie de publicaciones (Neve, 1998, Brussow y Hendrix, 2002; Hendrix,2002, etc.). La teoría evolutiva modular dice que cada fago es el resultado de una combinación favorable de módulos de genes con la misma función biológica. El intercambio de dichos módulos ocurre por recombinación entre virus diferentes relacionados sólo por poseer similar construcción modular. De esta manera, la evolución no actúa a nivel de virus intactos sino de unidades genéticas funcionales llamadas módulos.

La recombinación natural entre fagos puede ocurrir en células coinfectadas o en lisógenos infectados portadores de un fago normal o defectivo. Los profagos defectivos están distribuidos en una gran cantidad de líneas celulares por lo que probablemente constituyan una fuente de genes para la recombinación. Ésto resulta en un mosaico de genes.

Lawrence *et al.* (2002) proponen abandonar la clasificación de ICTV de órdenes, familias, géneros y especies y clasificar a todos los virus con módulos de propiedades similares, como grupos definidos llamados *modi*. Estos pueden

solaparse, lo que significaría que ocurren repetidamente en diferentes virus. El mismo virus puede pertenecer a varios *modi*.

En la actualidad se cuenta con más de 100 genomas completos de fagos y se espera miles más en los próximos años. Estas secuencias proveen información acerca de la biología de los fagos individuales, pero con el advenimiento de la tecnología de avanzada, es posible analizar las secuencias juntas y poder resolver cuestiones biológicas fundamentales relacionadas a las poblaciones. Éstas son: Cuál es la estructura de la población global de fagos? Cuál es su dinámica? Cómo evolucionan los fagos? Ésto es lo que se llama *Genómica Comparativa* (Brussow,2002).

En síntesis, la clasificación viral es útil en docencia, en identificación de fagos nuevos, en detección de relaciones con otros fagos, para crear bases de datos y colecciones y en °fagoterapia° e industria. Además, la clasificación genera nomenclatura útil, como por ejemplo: °myovirus T4° es mucho más abreviado que °fago T4 con una cola larga y contráctil°.

A.5. Clasificación actual de fagos

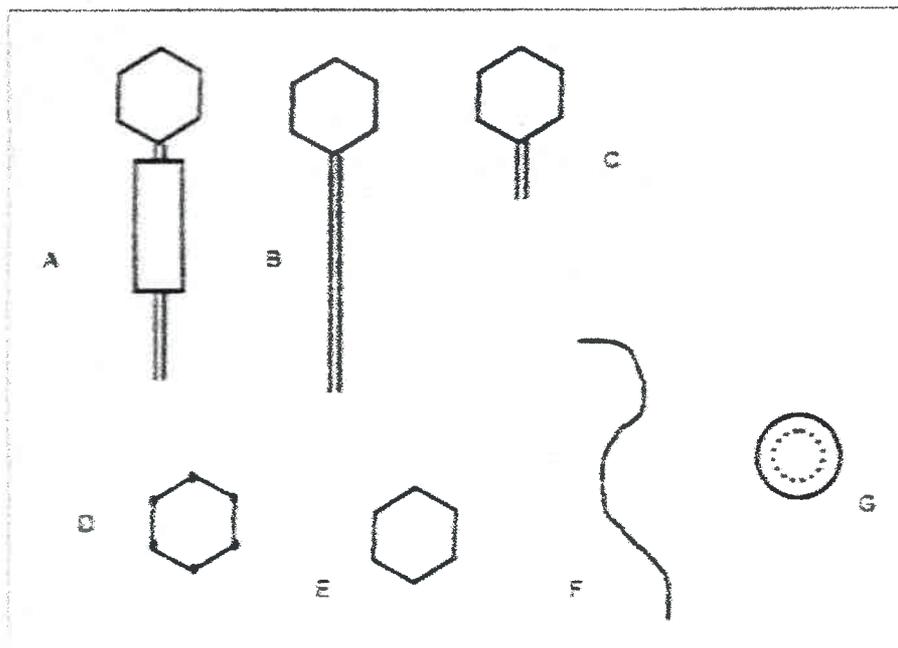
Los fagos infectan más de 140 géneros bacterianos (Ackermann,2001). Por ejemplo, aerobios y anaerobios, formadores de exosporas, cianobacterias, espiroquetas, mycoplasmas y clamydias, ramificadas, halófilas extremas o metanógenas, arqueobacterias hipertermófilas extremas que crecen a 100°C, etc. El colífago T7 se encuentra en endosimbiontes de paramecios o insectos.

Los fagos son extremadamente heterogeneos. La mayoría contiene DNA doble cadena, sin embargo, hay algunos que tienen DNA simple cadena, o RNA doble cadena. Algunos viriones tienen cola, otros son polihédricos, filamentosos o pleomórficos. La diversidad de fagos se refleja en sus propiedades biológicas.

Todos los fagos a DNA contienen una simple molécula de DNA. Varios tipos tienen envolturas lipídicas o vesículas internas. Más de 5.000 bacteriófagos han sido examinados por microscopía electrónica (Ackermann,2001). Esto demuestra que son la categoría de virus más observados.

Las clasificaciones más útiles son las de Bradley (Bradley, 1967), Ackermann (Ackermann, 1974) y Franckii (Franckii, 1991). El primero divide a los fagos en 7 grupos morfológicos (A,B,C,D,E,F,G) a la vez que correlaciona a cada uno de ellos con el tipo de ácido nucleico del virión (Figura 1)

Figura 1: Diferentes tipos morfológicos de los bacteriófagos (Bradley, 1967)



Ackermann subdivide cada tipo morfológico de la clasificación de Bradley en 3 subtipos en base a la forma de la cabeza del fago: isométrica (subtipo 1) y alargada o prolate (subtipos 2 y 3) que difieren en la longitud de la cabeza, la cual es mayor en el último caso.

Franckii organiza a los fagos en familias. Los que poseen cola son los más importantes, ya que constituyen el 95% del total y tienen la particularidad de tener ADN bicatenario.

Actualmente se los agrupa en un orden, 13 familias y 31 géneros. Las familias están definidas por la naturaleza de su ácido nucleico y la morfología del virión. Aunque hay aproximadamente 40 criterios de clasificación, no hay un criterio universal para géneros y especies.

A-Fagos con cola (Orden Caudovirales)

Constituyen el grupo más abundante y más distribuido de los virus bacterianos. Al menos 4950 fagos con cola han sido observados al microscopio electrónico (Ackermann,2001). Se han encontrado incluso en fósiles de 3,5 billones de años de antigüedad. Infectan tanto Eubacterias como Archaea. Esto sugiere que su aparición antecede la separación de esos reinos bacterianos. (Ackermann and DuBow, 1987, Hendrix, 1999).

Los viriones consisten en DNA doble cadena y proteínas. Tienen "simetría binaria", ya que sus cabezas (cápsides) tienen simetría cúbica y su cola es helicoidal.

No son virus envueltos. Sus cabezas son icosaedros. Las proteínas de la cápside están organizadas en capsómeros. Las colas son verdaderas hélices o discos y están usualmente provistas de estructuras de adsorción como placas basales, espículas o fibras. La composición del DNA generalmente se asemeja a la de sus células huéspedes. Los genomas son largos, complejos y más o menos organizados en bloques intercambiables o "módulos".

Algunos de estos fagos son virulentos y otros temperados.

Un criterio que se basa en la observación por microscopía electrónica de la morfología de la cola divide a estos fagos en tres familias:

Myoviridae, con colas contráctiles con vaina y tubo central.

Siphoviridae, con cola larga y no contráctil.

Podoviridae, con cola corta no contráctil.

Quince géneros han sido definidos en el grupo de los fagos con cola en la base del criterio relacionado a la estructura genómica y la replicación. Esta clasificación está en un comienzo.

B-Fagos polihédricos, filamentosos y pleomórficos.

No tienen cola. Incluyen aproximadamente 190 virus conocidos, que corresponden a menos del 4% de los virus bacterianos (Ackermann,2001). Están clasificados en 10 pequeñas familias que a veces sólo incluyen 1 género y especie. Estas familias difieren en propiedades fundamentales y constituyen muchos grupos filogenéticos independientes. Los fagos son de 3 tipos: polihédricos que tienen cuerpos icosaédricos o relacionados y simetría cúbica, filamentosos con simetría helicoidal y pleomórficos (pequeños tipos de forma variable sin eje de simetría obvio). Las partículas pueden ser envueltas o no. Estos fagos pueden ser virulentos o temperados.

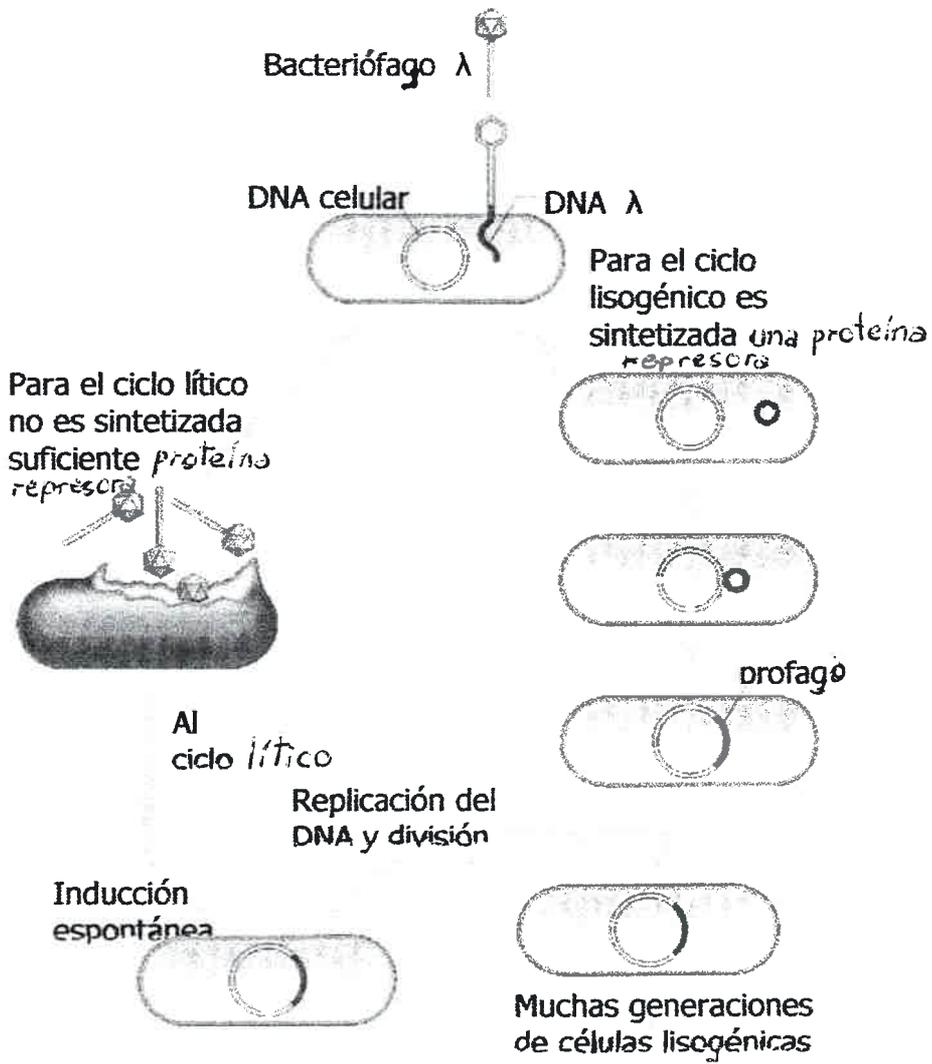
Tabla 2: Clasificación en familias de los fagos polihédricos, filamentosos y pleomórficos.

POLIHEDRICOS A DNA	POLIHEDRICOS A RNA	FILAMENTOSOS	PLEOMORFICOS
DNA simple cadena	RNA simple cadena	DNA simple cadena	DNA doble cadena
<i>Microviridae</i>	<i>Leviviridae</i>	<i>Inoviridae</i>	<i>Plasmaviridae</i>
DNA doble cadena	RNA doble cadena	DNA doble cadena	Fuselloviridae
Corticoviridae	Cystoviridae	Lipothrixviridae	Sulfolobus SNDV
Tectiviridae		Rudiviridae	

En base a su ciclo de vida, los bacteriófagos se dividen en:

- a) *virulentos o líticos*, los que sólo pueden propagarse a través de un ciclo lítico,
- b) *temperados*, los que pueden multiplicarse por la vía lisogénica o lítica . (Fig. 2)

Figura 2. Ciclos lítico y lisogénico de un bacteriófago



En ambos casos, la infección comienza con la unión del fago al receptor de la célula bacteriana, seguido de la inyección de su ácido nucleico hacia el citoplasma. Si es virulento, se inicia la replicación y la expresión temporaria de sus genes tempranos. Los transcriptos primarios o ARN mensajeros codifican las enzimas involucradas en la síntesis de ADN viral como la ADN polimerasa, ligasa, helicasa y primasa, necesarias para que se desencadene la infección. Luego continúa la transcripción de los genes de expresión tardía, implicados en la morfogénesis y en la liberación de la nueva progenie viral. Esta etapa final, se manifiesta como lisis o ruptura celular. El fago induce la síntesis de una enzima que es una lisozima llamada lisina fágica, la cual degrada el peptidoglicano de la pared de la célula bacteriana. En la práctica, la lisis se visualiza en un medio líquido como una clarificación del cultivo, mientras que en un medio agarizado, se observan placas o puntos claros denominados "placas de lisis", en las que no se encuentran bacterias viables, sólo restos celulares consecuencia de la lisis.

La acción de la enzima es fácilmente detectada por grandes halos de turbidez alrededor de las placas de lisis. Estos halos se deben al efecto lítico de la lisina fágica.

Esta lisina, cuando es liberada al medio ambiente, puede causar lisis de un cultivo starter ("lisis desde afuera").

Muchas cepas bacterianas son *lisogénicas*. El ciclo lisogénico es un paso alternativo en la replicación de los fagos. Siguiendo la adsorción y penetración del DNA viral, se reprime la reproducción de las nuevas partículas sintetizadas y el DNA del fago se integra en el cromosoma bacteriano por recombinación.

De este modo, no se produce lisis de la célula bacteriana infectada y el DNA del fago se replica sincrónicamente con el DNA de la bacteria.

En estos casos, la célula vive y se multiplica normalmente dando origen a una progenie de células infectadas, el fago que se replica en este caso se denomina *fago temperado o profago*.

Los profagos pueden ser liberados de las células huésped de dos maneras: espontáneamente o luego de la inducción con algún agente como la luz ultravioleta o tratamiento con bajos niveles de mitomicina C, que dañan el DNA y activan los sistemas SOS. Sin embargo, no todos los profagos son inducibles, en algunos virus temperados la expresión de los profagos tiene lugar sólo mediante fenómenos espontáneos.

En los virus virulentos, el DNA contiene información para la síntesis de varias enzimas y de otras proteínas indispensables para la reproducción del virus. El profago de los virus temperados lleva información similar, pero en la célula lisogénica ésta información permanece latente debido a que la expresión de los genes del virus está bloqueada por la acción de un represor específico codificado por el virus. En ciertas condiciones, el represor es inactivado y se efectúa la reproducción del virus, la célula se lisa y se liberan las partículas virales.

En estos casos el estado de latencia del profago se interrumpe para iniciar el ciclo lítico en forma espontánea o por inducción con agentes exógenos como: mitomicina C, radiación ultravioleta, peróxido de hidrógeno y altas temperaturas (Cluzel y col, 1987, Raya y col, 1989, Auad y col, 1997).

El valor de demostrar la lisogenia en cepas de bacterias lácticas radica en que los fagos temperados son fuentes potenciales de bacteriófagos líticos, por lo que representan una amenaza para el desarrollo normal de las fermentaciones lácticas. Como nuestro interés es seleccionar potenciales fermentos, es necesario conocer si los mismos son lisogénicos o no (Reinheimer, 1994).

Uno de los inconvenientes para poner en evidencia la existencia de nuevos fagos es la dificultad de disponer de bacterias indicadoras que sean susceptibles al ataque de los mismos. Por esta razón, la mayoría de los bacteriófagos se han identificado mediante estudios de microscopía electrónica (Auad L, 1998).

Aunque una bacteria lisogénica puede ser susceptible de infectarse por otros virus, no puede ser infectada por partículas virales del tipo para el cual ésta

es lisogénica. Este fenómeno se denomina *inmunidad*. Esta inmunidad es conferida gracias al mecanismo de represión intracelular que está bajo el control de los genes virales. En ocasiones es posible eliminar al virus lisogénico (curado de la cepa) mediante una fuerte radiación. Entre los escasos sobrevivientes puede haber algunas células que se hayan curado. Se supone que el tratamiento provoca que el profago se separe del cromosoma del huésped pero no se replica ni se pierde durante la proliferación celular subsecuente. Tales cepas curadas ya no son inmunes al virus y pueden ser utilizadas como un huésped adecuado para estudiar la duplicación del virus.

En la actualidad ha recobrado fuerza el interés por reflotar el concepto de *fagoterapia* como alternativa al problema de resistencia a los antibióticos.

Fagoterapia es el uso de bacteriófagos para el tratamiento de infecciones bacterianas. Debido a que las bacterias adquieren resistencia a antibióticos, la terapia por medio de fagos es una alternativa para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Puede utilizarse en humanos, animales y plantas.

En 1920, fueron utilizados fagos para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias. Los resultados no fueron muy alentadores debido a que las soluciones preparadas con fagos no estaban lo suficientemente caracterizadas ni purificadas y la especificidad no estaba muy bien comprendida.

Con el descubrimiento de la penicilina en la década del 40, la fagoterapia fue abandonada en los Estados Unidos y Europa, mientras los estudios continuaron en la Unión Soviética. Los antibióticos revolucionaron la medicina transformando muchas infecciones que antes eran letales, como la tuberculosis en problemas de salud menores. Pero su uso excesivo está haciendo que los antibióticos pierdan su efectividad a pasos agigantados y los científicos saben que tienen que encontrar pronto una alternativa para reemplazarlos.

Los bacteriófagos destruyen solamente una cepa bacteriana (son muy específicos), y no afectan a las benéficas, como las bacterias de flora normal del aparato digestivo. En contraste, la mayoría de los antibióticos son de amplio

espectro de acción. Esto significa que ahorran tiempo en el tratamiento, ya que no es necesario determinar el tipo de bacteria que causa la infección. Como desventaja del uso de antibióticos podemos citar que además de las bacterias patógenas, exterminan bacterias de flora normal.

Por estas razones, la fagoterapia se ha transformado en una de las prioridades de la medicina moderna y la biotecnología. (Sulakvelidze,2001)

A.6. Bacteriófagos en la Industria lactocasearia

Las infecciones fágicas en la industria fermentativa son de mucha gravedad porque provocan accidentes de fabricación que pueden comprometer considerablemente la calidad del producto, o en casos límites, bloquear la producción. En el transcurso de las fermentaciones sucesivas y, habiendo tenido la posibilidad de multiplicarse y de difundirse en el ambiente se nota una progresiva desaparición de microorganismos responsables de la fermentación con retardo en la acidificación y una consecuente variación en las características del producto. Por ejemplo, en la producción de yogurt, si el fago ataca los estreptococos estructurales se tiene una menor viscosidad, mientras que se nota una pérdida de sabor si el microorganismo atacado es el lactobacilo.

Si el ataque fágico es de proporciones aún mayores, los fermentos lácticos son prácticamente destruidos y la acidificación se detiene. Esto da la posibilidad de que se desarrollen agentes patógenos que encuentran facilitado su desarrollo por un ambiente poco ácido y sin competencia. Se tendrá, por lo tanto, una pérdida del producto o un riesgo de efectos negativos en el consumidor (Sozzi, 1994).

Los fagos de bacterias lácticas tienen una estructura binaria, formados por una cabeza y una cola. Adicionalmente, puede presentarse una placa basal dotada o no de fibras. La cabeza puede ser de forma icosaédrica o tetraédrica,

algunas pueden ser elongadas constituyendo una "cabeza prolata". La cola es un pequeño tubo que se une a la cabeza a través de un collar, siendo una estructura rígida o flexible que al microscopio electrónico aparece estriada, y las unidades proteicas que la constituyen están ordenadas en forma helicoidal, formando un canal interno. La cola tiene longitud variable y en algunos fagos puede aparecer una vaina contráctil. La placa basal es una estructura compleja que tiene como función el "anclaje" del fago sobre la célula sensible u hospedadora, y que puede poseer una o varias fibras útiles a este fin (Séchaud L, 1988).

El estudio taxonómico de los fagos que infectan bacterias lácticas, ha aportado un mayor conocimiento de la interacción entre fagos y bacterias huéspedes, también ha clarificado el origen de numerosos fagos que están presentes en el ambiente de fermentación de las industrias lactocasearias. La caracterización y diferenciación de los fagos de bacterias lácticas puede efectuarse sobre la base de: espectro de huéspedes, perfil proteico, morfología, serología y homología del ADN (Bradley D.E. 1967).

-El agrupamiento de los fagos en base al espectro de huéspedes no es un criterio muy útil en el estudio taxonómico, pero tiene importancia práctica.

-La separación de las proteínas estructurales de la cabeza y de la cola del fago, a través de un análisis electroforético, es una técnica muy usada para diferenciar fagos de lactococos y lactobacilos. Fagos de diferente morfología tienen un perfil proteico distinto.

-Los fagos pueden clasificarse también por su morfología, utilizando técnicas de microscopía electrónica. Se diferencian por la forma y dimensiones de la cabeza, tipo de cola (contráctil o no) y su longitud, presencia de collar entre la cabeza y la cola, la presencia de placa basal y de fibras, etc.

-Teniendo en cuenta la clasificación de Bradley (en grupos), los fagos de bacterias lácticas pertenecen a los tres primeros grupos de la misma. El más complejo (fagos del grupo A), está constituido por una cabeza con una silueta hexagonal, que puede o no ser elongada, y una vaina contráctil, que usualmente

es rígida y podría contener varios apéndices, tales como fibras o estructuras terminales. El segundo grupo (grupo B) en orden de complejidad posee también cabeza con silueta hexagonal y cola, pero ésta es relativamente flexible y puede o no presentar apéndices terminales, la longitud de la cola es mayor que el diámetro de la cabeza, y no posee vaina contráctil. El tercer grupo (grupo C) tiene cabeza hexagonal y cola, pero ésta es más corta que el diámetro de la cabeza, y podría contener apéndices, pero tampoco en esta morfología hay elementos contráctiles.

Por otra parte, según la clasificación de Ackermann, los fagos de bacterias lácticas detectados hasta el presente, pertenecen a los morfotipos A₁ (Familia *Myoviridae*), B₁ y B₂ (Familia *Siphoviridae*), C₁ y C₂ (Familia *Podoviridae*).

A.7. Lisogenia y fagos temperados en bacterias lácticas. (Neve H y Teuber M, 1991)

Muchas cepas de lactococos y lactobacilos se sabe que son lisogénicas (Coetzee y de Klerk, 1962; Park y McKay, 1975; Reyrolle y col., 1982; Sechaud y col, 1988, 1989; Teuber y Lembke, 1983).

Se estima que un alto número (60-70%) de los starters formulados con cepas de lactococos son lisogénicos; ésto es menos usual entre los starters formulados con lactobacilos.

La lisogenia es frecuente en *Lactococcus lactis* y en lactobacilos, pero no en *Streptococcus thermophilus* (Davidson, 1996).

En el pasado, la comunidad científica ha discutido si las cepas starter lisogénicas podrían ser el origen de fagos virulentos entre las bacterias lácticas. Se probó para una cepa lisogénica de *Lactobacillus casei*, que un profago puede convertirse en un fago virulento (Shimizu-Kadota y col, 1983).

La presencia de cepas lisogénicas de bacterias ácido lácticas en cultivos iniciadores ha sido considerada por mucho tiempo como responsable de la infección por fagos (Carminati, 1991). La detección de cepas lisogénicas de bacterias lácticas explica algunas infecciones por fagos que no podrían haberse

entendido de otro modo y que afectan gravemente la calidad y regularidad de un proceso de producción.

Los profagos pueden ser liberados del ADN de la célula huésped en forma espontánea, luego de la inducción con luz UV o el tratamiento con bajos niveles del antibiótico mitomicina C. Esta inducción resulta en la producción de nuevas partículas fágicas capaces de lisar las células bacterianas y es comparable a un ciclo lítico regular de infección. La inducción de fagos temperados obtenida por radiación u.v. y con mitomicina C ha sido particularmente estudiada para los estreptococos mesófilos (Kozak y col, 1973; Mc Kay y col, 1973; Lowrie, 1974; Park y col, 1975; Terzaghi y Sandine, 1981; Reyrolle y col, 1982; Chopin y col, 1983). Más recientemente, fagos temperados fueron inducidos en lactobacilos homofermentativos termofilicos como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus acidophilus* (Mata y col, 1986; Cluzel y col, 1987; Chow y col, 1988; Raya y col, 1989, Séchaud y col, 1989, Auad y col, 1997).

Ya que se ha reportado la liberación espontánea de partículas virales a partir de cepas lisogénicas, se recomienda precaución en el uso de cepas lisogénicas e indicadoras juntas en cultivos starters mixtos (Huggins y Sandine, 1977).

A.8. Pseudolisogenia

Muchos cultivos starters mixtos tradicionales de composición indefinida están permanentemente infectados con un bajo número de fagos virulentos, los cuales se multiplican en un número limitado de células sensibles en el cultivo (de Vos, 1989). Debido a que el cultivo starter no es lisado totalmente, este estado de portador de fagos puede permanecer sin ser detectado. Este fenómeno es llamado pseudolisogenia.

A.9. Genoma de los bacteriófagos de LAB (Venema G, 1999)

El desarrollo de herramientas genéticas sofisticadas durante los pasados 15 años ha incrementado el conocimiento de bacterias ácido lácticas (BAL) y sus bacteriófagos. Este conocimiento relaciona tanto las secuencias de lectura abierta (ORF), con la función de las secuencias del DNA no codificante. La comparación de las secuencias nucleotídicas de varios bacteriófagos BAL ha revelado que sus cromosomas tienen una estructura modular fija, cada módulo tiene un set de genes involucrados en una fase específica del ciclo de vida del bacteriófago. Los genes de los bacteriófagos BAL y las secuencias de DNA han sido usadas para la construcción de sistemas de expresión inducibles con la temperatura, sistemas de integración de genes y sistemas de defensa de los bacteriófagos.

La función de varias ORF y unidades transcripcionales han sido identificadas y caracterizadas en detalle. Muchas de ellas podrían tener aplicaciones prácticas como la lisis inducida de BAL para mejorar la maduración del queso o la dirección del flujo de carbono para la producción de un enantiómero específico de un aminoácido.

El primer genoma de un bacteriófago de BAL secuenciado completamente fue el de bIL67, que es un bacteriófago lítico de lactococos en 1994. En la actualidad, están disponibles secuencias completas de genomas de bacteriófagos virulentos y temperados que infectan varias especies de BAL. Además, se puede comparar su organización genética y por comparaciones de homología, asignar probables funciones a varias de sus ORF.

A.10. Organización modular

En 1980 Botstein desarrolló la teoría evolutiva modular según la cual, cada fago es el resultado de una combinación favorable de módulos de genes con la misma función biológica. El intercambio de dichos módulos ocurre por

recombinación entre virus diferentes relacionados sólo por poseer similar construcción modular. De esta manera, la evolución no actúa a nivel de virus intactos sino de unidades genéticas funcionales llamadas módulos.

La recombinación natural entre fagos puede ocurrir en células coinfectadas o en lisógenos infectados portadores de un fago normal o defectivo. Los profagos defectivos están distribuidos en una gran cantidad de líneas celulares por lo que probablemente constituyan una fuente de genes para la recombinación.

Además de la teoría de evolución modular, existen otros caminos posibles: mutaciones puntuales, recombinación ilegítima y arreglos intragenómicos como deleciones, duplicaciones, inversiones y transposiciones.

La figura 3 muestra:

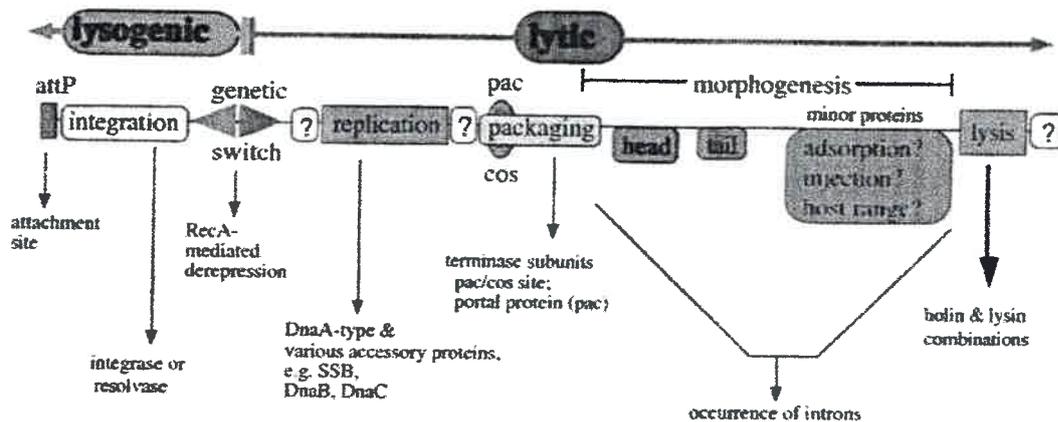
-los genes involucrados en la lisogenia son transcritos divergentemente de aquellos requeridos para un ciclo lítico.

-los elementos "disparadores" de ciclo lítico o lisogénico están localizados entre sus genes.

-adyacente al extremo 3' de un disparador genético hay un cluster de genes para la iniciación de la replicación del bacteriófago. Estos genes están próximos a los clusters involucrados en el empaquetamiento del ADN dentro de las cabezas de los fagos, dirigiendo la morfogénesis de los bacteriófagos y los genes requeridos por la lisis del huésped.

De este modo, el cromosoma del bacteriófago es altamente modular con genes funcionalmente relacionados ubicados juntos, en un orden fijo. El cambio de los módulos en los bacteriófagos por recombinación ha sido usado para explicar la variabilidad y evolución entre los bacteriófagos.

Figura 3: Esquema de organización modular



Organización genómica modular encontrada en un gran grupo de pequeños bacteriófagos de cabeza isométrica. Las flechas de la parte superior de la figura coloreadas en verde y rojo indican la dirección transcripcional durante el ciclo lítico y lisogénico, respectivamente (nótese que en los fagos líticos la región de DNA transcrita no está presente o lo está sólo parcialmente. La función presumible de los módulos de DNA específicos se indica en la parte media de la figura y las regiones de función desconocida se indican por signos de interrogación. Las flechas verticales señalando hacia abajo indican información adicional en la funcionalidad o composición del módulo de DNA específico.

A.11. Mecanismos de resistencia a fagos

El estudio de la interacción bacteriófago-huésped ha sido realizado en varios géneros de bacterias lácticas. Los mecanismos como inhibición de adsorción, restricción y modificación e infección abortiva que han sido detectados y descritos fenotípicamente, están sujetos a estudios moleculares y esto lleva al mejor conocimiento de la naturaleza y variedad de los sistemas de resistencia

empleados por las bacterias lácticas para combatir el ataque fágico (Colin H., 1993)

Las bacterias ácido lácticas han desarrollado una variedad de mecanismos de defensa diferentes, los cuales se mencionan brevemente a continuación:

A.11.1 Bloqueo de la adsorción

En los sistemas homólogos fago/huésped, el fago se adsorbe eficientemente a la célula bacteriana. La eficiencia de unión puede ser determinada experimentalmente, y usualmente revela valores mayores a un 90% (Keogh, 1973). Algunas cepas resistentes a los fagos, sin embargo, muestran poca eficiencia de unión, indicando que los sitios receptores a fagos han sido modificados de modo que los fagos no pueden atacar. Además, enmascarando los sitios receptores mediante los componentes de la pared celular, se puede prevenir la adsorción (Sijtsma y col, 1990). En ambos casos, la insensibilidad a los fagos se debe al impedimento en la adsorción fágica.

A.11.2. Bloqueo de penetración del ADN

En este caso, el virus se adsorbe eficientemente pero la célula inhibe la penetración de su ADN. No es suficiente la adsorción viral. El ADN queda retenido en la cápside. De este modo, no se completa el ciclo lítico. Se especula que hay proteínas en la membrana celular del huésped que intervienen en la penetración del ADN fágico y que a su vez, son el sitio blanco de uno de los mecanismos de defensa (Daily, 1996). El primer caso descrito corresponde a *Lactobacillus casei* YIT 9002 resistente al fago PL-1.

A.11.3. Sistema Restricción/Modificación

Muchas bacterias ácido lácticas tienen enzimas de restricción que "reconocen" el ADN fágico como foráneo luego de la inyección en el interior de la célula e inmediatamente lo degradan. Sin embargo, algunos fagos pueden escapar a estos mecanismos de defensa, ya que su ADN es modificado por otra enzima bacteriana, una enzima de modificación, que generalmente es una metilasa. Este ADN modificado no puede ser degradado por las enzimas de restricción. Este sistema de defensa se llama sistema R/M (restricción/modificación). Un sistema R/M efectivo es la causa de la pobre propagación de muchos fagos en la bacteria huésped. Debido a la acción de las proteasas que modifican el ADN fágico, se suele utilizar este sistema en combinación con otros sistemas R/M o con mecanismos Abi (Infección abortiva).

A.11.4. Infección abortiva (ABI)

En este caso la infección fágica es inhibida después de las primeras etapas del ciclo (adsorción, inyección del ADN y expresión génica temprana). Este sistema está codificado en plásmidos. Las células mueren, pero la liberación de progenie viral es minimizada o eliminada. Este mecanismo, como así también el sistema R/M son generalmente sensibles a la temperatura. Un aumento en la misma (por ejemplo de 30°C a 37°C), puede resultar en una disminución o pérdida de la resistencia a fagos de un starter a lactococos. Ésto tiene importancia práctica, ya que se usan diferentes temperaturas durante la producción de quesos (por ejemplo el paso de cocimiento del queso).

A.11.5. Inmunidad por lisogenia

Existe otro mecanismo por el cual, aunque una bacteria lisogénica puede ser susceptible a la infección por otros fagos, no puede ser infectada por partículas virales del tipo para la cual es lisogénica. Esta inmunidad es conferida gracias al mecanismo de represión intracelular que se denomina *inmunidad a la superinfección* y está bajo el control de los genes del virus (Klaenhammer T.R.,1994).

Las cepas lisogénicas que llevan profagos son insensibles a los ataques por fagos similares, ya sean virulentos o temperados. Luego del curado de la cepa, sin embargo, ésta se torna sensible.

Por lo visto anteriormente, los fagos y las bacterias huéspedes están estrechamente conectadas en una relación biológica balanceada, la cual ha sido seriamente alterada por el uso industrial de las bacterias ácido lácticas. De este modo, ambos componentes de este sistema biológico han sido analizados para profundizar en los mecanismos de la biología de fagos.

Uno de los objetivos de los científicos y técnicos es controlar los ataques por fagos en la industria láctea. Sin embargo, para la selección de cepas

insensibles a los fagos (ya sea por métodos clásicos de selección o nuevas técnicas genéticas), el conocimiento profundo de todos los bacteriófagos que pueden atacar en este medio ambiente es esencial.

A.12. Caracterización de los fagos

Los fagos pueden ser estudiados por varios métodos:

A.12.1. Rango de huéspedes

Se entiende por "Rango de Huésped de un fago" al espectro de bacterias susceptibles a la acción lítica del mismo. Estas células se denominan **cepas indicadoras** porque sirven para propagar (amplificar) y para poner en evidencia bacteriófagos.

Los bacteriófagos tienen un rango de huésped muy limitado.

El rango de huésped de un fago se puede determinar testeando un bacteriófago particular contra una variedad de diferentes cepas starters. Por ejemplo: el rango de huéspedes de los fagos lactococales está principalmente restringido a una subespecie (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o *L. lactis* subsp. *cremoris*). Los fagos lactococales y los de streptococos termófilos revelan un amplio espectro de diferentes modelos líticos. Estos modelos representan una relación particular fago/ huésped, la cual cambia rápidamente debido a la modificación del fago (por ej., por la acción del sistema restricción/ modificación o por modificación del sitio receptor en la bacteria). Sin embargo, en el caso de bacterias lácticas, los rangos de fago/ huésped y el modelo de cepas sensibles son de gran relevancia en el campo práctico (Mata y Ritzenthaler, 1988).

A.12.2. Morfología

Debido a su pequeño tamaño, los bacteriófagos pueden ser examinados en un microscopio electrónico de transmisión. Los fagos virulentos de lactococos están compuestos de una cabeza y una cola cuya longitud ronda entre

24 y 500 nm ($1 \text{ nm}=10^{-9}\text{m}$) (Lembke, 1980). Estos fagos muestran un amplio espectro de tipos morfológicos diferentes con diferentes formas de cabeza. Los fagos más comunes son de pequeñas cabezas isométricas (50-55 nm de diámetro), luego los de cabeza alargada (65 nm de largo) y menos frecuentemente grandes cabezas isométricas (diámetro de 80 a 85 nm). Muchos elementos estructurales finos de las colas fágicas han sido reportados, incluyendo la presencia o ausencia de collares entre la cabeza y la cola y/o la presencia de diferentes placas basales (generalmente con apéndices adicionales y espículas o fibras de la cola). Esta diversidad de morfologías de los fagos también se ve en los temperados de lactococos.

Los fagos de lactobacilos termofílicos también revelan una amplia variedad de tipos morfológicos. Los fagos de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* y subsp. *bulgaricus* tienen cabezas isométricas o alargadas y colas flexibles no contráctiles. Sin embargo, los fagos de streptococos termófilos pertenecen a un tipo morfológico (cabeza isométrica y larga cola).

Los fagos virulentos de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* son de cabezas isométricas y pueden diferir en la longitud de la cola.

A.12.3. Perfil proteico

Las partículas de fagos están compuestas de diferentes proteínas estructurales de la cabeza y la cola, que pueden liberarse a alta temperatura en la presencia del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), y luego separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS page). Luego, las diferentes bandas proteicas son teñidas con una coloración específica para proteínas. En general, los fagos revelan de 1 a 3 principales bandas de proteínas y series menores. Los fagos de diferentes morfologías muestran diferentes perfiles proteicos.

A.12.4. Serología

Ya que las partículas de fagos están compuestas de proteínas, se pueden detectar anticuerpos contra este material antigénico. Para este propósito, las partículas concentradas y purificadas son inyectadas en un animal (normalmente conejo). Estos antisueros específicos de fagos pueden ser usados para diferentes técnicas inmunológicas.

A.12.5. Test de neutralización

Concentraciones conocidas de fagos son incubadas con antisuero específico de fagos en diferentes diluciones (usualmente 1:100 a 1:10.000). La reacción antígeno-anticuerpo específica resultará en una inactivación completa de las partículas de fagos y se determina el porcentaje de sobrevivientes.

A.12.6. Western blot

Las proteínas del fago son separadas por SDS-PAGE, luego transferidas electroforéticamente e inmobilizadas en una membrana de nylon. Luego de este paso, la membrana es incubada con un antisuero fago-específico, de este modo, lavando la membrana para remover los antisueros, se detectan reacciones cruzadas entre antígeno/ antisuero específicos, cuando se incuban con anti-anticuerpos. Estos anticuerpos secundarios están acoplados con un complejo enzimático, que puede convertir un sustrato cromogénico en un derivado coloreado, el cual marca la reacción específica antígeno-anticuerpo. Esta técnica fue usada para la diferenciación de los fagos de lactococos y lactobacilos y se reportó una buena correlación entre los datos morfológicos e inmunológicos.

A.12.7. ELISA

El procedimiento básico de ELISA es similar al método de detección de proteínas de fagos homólogos luego del Western-blotting en membrana de nylon.

A.12.8. Microscopía inmuno-electrónica

La respuesta inmunológica de un antisuero fago específico hacia una partícula de un determinado fago puede ser examinada directamente por microscopía electrónica. En el caso de una reacción positiva antígeno-anticuerpo, los anticuerpos precipitados se encontrarán adheridos a las partículas fágicas. Con esta técnica, fueron identificados fagos idénticos de lactococos.

A.12.9. Biología molecular de fagos

Durante los últimos 10 años, muchos microbiólogos de la industria láctea han dirigido sus estudios hacia la caracterización del genoma fágico:

A.12.9.1. Análisis de enzimas de restricción

Una importante herramienta para la caracterización de ADN doble cadena es el uso de endonucleasas de restricción, las cuales reconocen y cortan secuencias específicas de ADN. Los fragmentos resultantes de diferentes tamaños son separados por electroforesis en geles de agarosa y dan perfiles específicos.

El ADN de muchos fagos de lactococos tiene un bajo número de sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. Se cree que ésta es una respuesta de evolución del fago hacia su bacteria huésped. Las enzimas de restricción son enzimas bacterianas que degradan el ADN de fagos luego de la inyección y son parte del sistema de defensa de la bacteria ante el fago.

A.12.9.2. Determinación de mapas de restricción

Digiriendo el DNA del fago con una variedad de diferentes enzimas de restricción, se puede determinar la posición relativa de sus sitios de reconocimiento y corte en el genoma. Estos datos permiten la construcción de un mapa de restricción (mapa físico). Se han construido mapas físicos para los más comunes fagos de lactococos, tanto virulentos como temperados. Muchos fagos

contienen moléculas de ADN lineal, que puede formar círculos al “pegarse” los extremos de ese ADN simple cadena por cortas regiones cohesivas.

Ya que el ADN puede circularizarse en los extremos cohesivos o “pegajosos”, la microscopía electrónica del ADN revela una mezcla de moléculas de ADN lineal y circular.

A.12.9.3. Tamaño genómico

El tamaño del genoma de los fagos lactococales varía considerablemente desde 18,1 a 134 kilobases, mientras que el de los lactobacilos tienen genomas de 34 a 45 kb. El tamaño del genoma fágico se determina sumando los tamaños de los fragmentos de ADN de un digerido con enzima de restricción determinado.

Alternativamente, el tamaño genómico puede ser medido directamente por microscopía electrónica.

A.12.9.4. Hibridización ADN/ ADN

Esta técnica es excelente para determinar las relaciones genéticas (homología de ADN) entre los fagos. En principio, el ADN doble cadena de dos fagos es convertido en cadenas simples complementarias. Luego, los dos ADNs son mezclados y se permite el apareamiento de las dos cadenas. Mientras mayor sea el grado de similaridad entre ellos, habrá mayor hibridización.

Esta técnica es altamente sensible y los fagos lactococales han sido diferenciados en al menos siete grupos de virulentos y dos grupos de temperados.

Una estrecha relación genética entre fagos virulentos y temperados ha sido demostrada para los fagos de lactobacilos (Lahbib-Mansais et al., 1988) y para lactococos (Lautier, 1987).

A.13. La industria lactocasearia en Argentina

Los cultivos naturales usados en la elaboración de quesos son asociaciones microbianas complejas constituidas por una microflora predominante en bacterias lácticas y ciertos microorganismos no lácticos como contaminantes. En Francia, se emplean en la elaboración de Gruyere y Emmental (Valles, 1972). En Italia para el Grana, Provolone y ciertos tipos de quesos Mozzarella (Coppola, 1988).

En Argentina, estos cultivos naturales son ampliamente usados en la producción de quesos de pasta dura (Reggianito, Sardo, Provolone y Barra). Las diferencias geográficas y estacionales provocan modificaciones en los cultivos naturales. Estos starters no pueden ser reemplazados por los comerciales ya que habría pérdidas en la calidad organoléptica de los quesos, que son muy característicos de cada región (Reinheimer J, 1995). La microflora compleja de los cultivos naturales es esencial para un buen desarrollo de aroma (Coppola, 1988).

A pesar del amplio uso de los sueros naturales en Argentina, no se han realizado muchos estudios en lo referente a las características microbiológicas y tecnológicas de estos cultivos, de modo que no hay base científica para corregir comportamientos no esperados en el suero (Reinheimer, 1995).

A.14. Enterococos en la industria lactocasearia.

Los enterococos son bacterias ácido lácticas (LAB) típicas. El género *Enterococcus* ha sido asociado con alimentos fermentados, como los quesos tradicionales europeos en los cuales las especies más frecuentemente aisladas son *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. durans*. Estos microorganismos juegan un rol en la maduración y al aroma de los quesos (Macedo et al., 1995; Freitas et al., 1995; Centeno et al., 1996; López-Díaz, 2000).

Los quesos tradicionales en los países mediterráneos son elaborados principalmente con leche de cabra y oveja y, menos comunmente, con leche de vaca. Estos quesos tienen características organolépticas propias. Los estudios en la microflora de quesos como Feta, Kasseri, Fiore Sardo, Manchego, Roquefort, Montasio, Asiago y otros, de países mediterráneos como Grecia, Italia, España y Francia, indican que los enterococos juegan un importante papel en la maduración de estos quesos, contribuyendo a su típico sabor. Los enterococos involucrados provienen de contaminación medioambiental o de cultivos iniciadores naturales.

Los enterococos pueden crecer fácilmente en un medio ambiente peculiar como es el de estos quesos (alto contenido de sal y bajo pH), mientras otras bacterias ácido lácticas pueden desarrollar pobremente en estas condiciones. Además, estos microorganismos cumplen un papel en otros alimentos fermentados como aceitunas, salchichas, vegetales y ciertos alimentos africanos fermentados.

La naturaleza ubicua y la persistencia explica por qué los enterococos están asociados con numerosos habitats. Están bien adaptados, ya sea a los alimentos como a los ecosistemas intestinales y, debido a su persistencia y el origen típico de muchas cepas, se los menciona como indicadores de contaminación fecal. Han sido ocasionalmente implicados como la causa de enfermedades alimentarias.

Pueden ser considerados agentes deseables en fermentaciones lácticas tradicionales, en las cuales cumplen un rol benéfico (Franz y col, 1999). Se suelen usar como cultivos iniciadores (Giraffa, 1997). Sin embargo, en la actualidad, su potencial como cultivo iniciador seguro y su uso como probiótico humano y animal es cuestionado en vista a la asociación clínica de algunas cepas de *E. faecium* y *E. faecalis*, como así también a la transferencia vertical como horizontal de la resistencia a antibióticos.

Algunas cepas de *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. casseliflavus* son usadas como probióticos en humanos y animales (Fuller, 1989; Gardiner, 1999;

Gelsomino, 2003). La mayoría de las cepas usadas como probióticos han derivado de humanos sanos; están naturalmente asociadas con las superficies mucosas de la boca, tracto gastrointestinal y genitourinario de infantes y adultos, donde son comensales típicos. Varias categorías de probióticos están disponibles en el mercado. Los efectos benéficos están relacionados con el mantenimiento o restauración de la microflora intestinal y prevención o reducción de desórdenes gastro intestinales, alivio a la intolerancia a la lactosa, reducción en los niveles de colesterol sérico, actividad anticarcinogénica, estimulación del sistema inmune y mejoramiento de los valores nutricionales de alimentos (Holzapfel y col, 1998).

Algunos enterococos producen varios componentes metabólicos que dificultan el crecimiento de bacterias indeseables (Fons, 2000) y otros cumplen un rol benéfico en el desarrollo de aroma en los quesos (Clark W. 1966; Neviani, 1982).

B. OBJETIVOS

B. OBJETIVOS

Los bacteriófagos líticos y temperados de bacterias lácticas constituyen una de las principales causas de falla en las fermentaciones industriales (Whitehead, 1953). La multiplicación de los fagos decrece o inhibe completamente la habilidad de las bacterias lácticas para producir ácido láctico. Este problema, con el que se confrontan habitualmente los queseros, produce pérdidas económicas importantes.

Diversas estrategias han sido diseñadas y aplicadas para superar el problema de la sensibilidad de los fermentos al ataque de los fagos. Una forma tradicional es usar sistemas de rotación de cultivos bacterianos de cepas fermentadoras. En la industria normalmente se utilizan iniciadores de fermentación (starters) conocidos e integrados por más de un microorganismo. El problema que suele aparecer en las plantas industriales es que estas cepas bacterianas no son resistentes a los bacteriófagos locales.

En la zona sur de la Provincia de Córdoba, para la elaboración de tales productos se aprovechan las fermentaciones espontáneas realizadas por las bacterias propias de la leche.

El interés de nuestro grupo de trabajo fue caracterizar la flora autóctona de productos lácteos regionales y desarrollar, en base a ella, fermentos de uso local.

Para ello es de suma importancia estudiar la presencia de lisógenos en esta flora para evitar su uso en los fermentos a desarrollar.

Además, en algunos casos se ha demostrado que los fagos temperados son fuente de fagos líticos, que podrían destruir las células bacterianas y malograr la fermentación. En todos los casos, debido a que la lisogenia está ampliamente distribuida entre las bacterias lácticas, las cepas lisogénicas pueden servir como reservorio de fagos en las plantas industriales (Reinheimer, 1994).

Por ello en el presente estudio se propone:

Objetivo General

Determinar el estado lisogénico de cepas de bacterias lácticas regionales utilizadas para elaborar productos fermentados y caracterizar parcialmente sus fagos temperados.

Objetivos específicos

- ° Aislar e identificar bacterias lácticas de leche cruda, lactosuero, suero fermento natural y quesos del sur y centro de la Provincia de Córdoba.
- ° Evaluar el estado lisogénico de las cepas regionales seleccionadas.
- ° Aislar los bacteriófagos temperados y analizar parcialmente su material genético.
- ° Estudiar el rango de huéspedes de los bacteriófagos aislados

C. MATERIALES Y METODOS

C. Materiales y Métodos

C.1. Medios de Cultivos, Reactivos y Soluciones

MRS (Man y col, 1960)

Peptona, 10 g; extracto de carne, 5 g; extracto de levadura, 5 g; D-glucosa, 20g; Tween 80, 1 ml; citrato de amonio dibásico, 2 g; acetato de sodio, 5 g; MgSO₄ anhidro, 0,1 g; MnSO₄·7H₂O, 0,05 g; K₂HPO₄, 2 g; agua destilada, c.s.p. 1000 ml; pH 6,5 ± 0.1 (BIOKAR).

LAPTg (Raibaud y col, 1961)

Peptona de carne, 1,5 g; triptona, 1,5 g; extracto de levadura, 1 g; glucosa, 1 g; Tween 80, 1 ml; agua destilada, c.s.p. 1000 ml; pH 6.0.

Elliker (Elliker y col, 1956)

Triptosa, 3 g; extracto de levadura, 0,75 g; gelatina, 0,37 g; dextrosa, 1 g; lactosa, 1 g; sacarosa, 1 g; NaCl, 0,3 g; acetato de sodio, 0,1 g; ácido ascórbico, 0.1 g; agua destilada, c.s.p. 1000 ml; pH 6.8.

Medio de Clark y Lubs

Caldo glucosa-fosfato: peptona, 5 g;
D-glucosa, 5 g;
K₂HPO₄, 5 g;
agua destilada, c.s.p. 1000 ml.

Reactivo A: alfa naftol al 5% en etanol absoluto.

Reactivo B: KOH al 40% en agua destilada.

Medio Agar Bilis (Norris, 1970)

Extracto de carne, 3 g;

bacto peptona, 5 g ;

NaCl, 5 g ;

bilis de buey deshidratada 40 g;

agar, 9 g;

agua destilada, c.s.p. 1000 ml.

Medio de Facklam and Wilkinson (extraído del trabajo de Tesis Doctoral de la Dra. Graciela Savoy de Giori)

Caldo infusión cerebro corazón, 25 g;

NaCl, 39,92 g;

glucosa, 1 g;

agua destilada, c.s.p. 1000 ml;

pH 7-7,2

Medio de Shattock y Hirsch (Tesis Doctoral de la Dra. Graciela Savoy de Giori, CERELA, Tucumán)

A-Caldo glucosa Lemco pH 9,6 ; D-glucosa, 10 g; extracto de carne, 10 g; peptona, 10 g; NaCl, 5 g; agua destilada, c.s.p. 1000 ml;

B-Solución buffer: glicerina, 7,5 g; NaCl, 5,85 g, agua destilada, c.s.p. 1000 ml.

Agar sorbato (Reuter, 1970)

Peptona de caseina, 10 g; extracto de carne, 10 g; extracto de levadura, 5 g; D(+) glucosa, 20 g; acetato sódico, 5 g; citrato sódico, 3 g; Tween 80, 1 ml;

MgSO₄.4H₂O, 0,2 g; MnSO₄.7H₂O, 0,05 g; sorbato de potasio, 0,54 g; agua destilada, c.s.p. 1000 ml; pH 5 ± 0.1.

Medio de Gibson (extraído de la Tesis Doctoral de la Dra. Graciela Savoy de Giori)

Extracto de levadura, 2,5 g;
D-glucosa, 5 g;
leche descremada reconstituida, 800 ml;
agar nutritivo, 200 ml;
solución de $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,4%, 10 ml.

M17 (Terzaghi y Sandine, 1975)

Triptona, 2,5 g; peptona de carne, 2,5 g; peptona de harina de soja, 5 g; extracto de levadura, 2,5 g; extracto de carne, 5 g; lactosa, 5 g; glicerofosfato de sodio, 19 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g; ácido ascórbico, 0,5 g; agua destilada, c.s.p. 1000 ml. pH 7.1 ± 0.2 . (BIOKAR)

Buffer TE

Tris-HCL	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8	

Buffer SM

Para 1 litro:

NaCl	5,8 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0 g
Tris-HCl 1M (pH 7,5)	50 ml
Gelatina al 2%	5 ml

Buffer TAE

TRIS-Acetato 0,04 M

EDTA 0,001 M

pH= 8

Buffer de siembra para electroforesis (5X) (Sambrook y col, 1989)

Cianol xileno 0,25%

Azul de Bromofenol 0,25%

Sacarosa 4

C.2. MÉTODOS

Aislamiento de Bacterias Lácticas

Se procesaron muestras de lactosuero y quesos artesanales elaborados en la región, leche cruda y suero-fermento utilizados en la elaboración de los mismos.

Las muestras se recolectaron en recipientes de plástico, con tapa a rosca, estériles y se trasladaron refrigeradas al laboratorio para su inmediato procesamiento.

Preparación de muestras de quesos (Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 1978)

Se obtuvo la muestra con sacabocado, insertando el mismo en forma oblicua, hacia el centro del queso. Se tomaron al menos 5 muestras representativas de distintos lugares del mismo, descartando la porción correspondiente a los 2 cm. superficiales.

Se trituraron y mezclaron 11 g de esta muestra con 99 ml de citrato de sodio al 2%, precalentado a 40°C, en una licuadora previamente desinfectada con hipoclorito de sodio 200 ppm durante 5 min y enjuagada con tiosulfato de sodio al 0.1% y agua estéril. Se mezcló para lograr la emulsificación de la muestra, invirtiendo el recipiente para resuspender las partículas de las paredes interiores. Posteriormente se realizaron diluciones decimales y se procedió a la siembra en distintos medios de cultivo.

Preparación de las muestras de leche, lactosuero y suero fermento (Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 1978)

Se homogeneizaron 10 ml de muestra en 90 ml de citrato de sodio al 2% precalentado; a continuación se realizaron diluciones decimales y se prosiguió como en la muestra anterior.

De cada muestra se sembraron 3 diluciones por duplicado en los siguientes medios: LAPTg, Elliker, M17, Acido sórbico, MRS, depositándose 0.1 ml en superficie y diseminándose con espátula de Drigalsky.

En los quesos de pasta dura, la temperatura de incubación fue de 30°C; en los de pasta blanda, de 37°C. Se incubó de 72 a 96 hs, en microaerofilia, lograda por combustión de oxígeno.

Se eligieron las placas con aproximadamente 100 colonias desarrolladas, de las cuales se seleccionaron aquellas macroscópicamente diferentes y que respondían a las siguientes características: cocos o bacilos, Gram positivos, catalasa negativa, no esporulados e inmóviles.

Fue necesario reaislar 3 veces consecutivas en medio sólido por estrías por agotamiento para tener la certeza que la colonia provenía de un clon.

Conservación de los aislamientos y cepas

Tanto las cepas de bacterias lácticas de la colección de CERELA como aquellas aisladas durante el presente estudio fueron conservadas por congelamiento a -20°C y -80°C , utilizando como medio crioprotector, caldo de cultivo (MRS) adicionado de 15% de glicerol.

Congelamiento en caldo MRS adicionado de glicerol

Las cepas fueron desarrolladas durante 16-18 hs en caldo MRS a 32°C , centrifugadas 2 veces 10 min a 5000 rpm, y resuspendidas en medio fresco. Se descartó el sobrenadante y se agregó la solución crioprotectora (caldo MRS adicionado con 15% de glicerol).

Fracciones de 1 ml fueron conservadas en crioviales estériles a -20°C y -80°C .

Las cepas conservadas por congelamiento, se reactivaron en caldo MRS estéril a 32°C ; los cultivos utilizados en las diferentes experiencias del presente estudio fueron preparados por reinoculación al 2% en caldo MRS fresco e incubación a 32°C durante 16-18 hs.

Microscopía óptica

A partir de cultivos de las cepas en MRS, se realizaron observaciones microscópicas de frescos y de frotis teñidos con la coloración de Gram, con el

objeto de controlar la pureza de los cultivos, así como determinar la morfología y agrupación celular.

Estudio del estado lisogénico de los aislamientos por Inducción fágica de los mismos con mitomicina C (MC) (Cluzel y col,1987 modificada en CERELA)

Se inocularon al 2% los cultivos overnight a inducir, en 3 tubos con 5 ml de caldo MRS.

Se determinó la densidad óptica (DO) inicial a 600 nm. Se incubó a 32 ó 37°C de acuerdo a la procedencia de la cepa (queso pasta dura: 37°C, pasta blanda, leche, suero fermento: 30°C). hasta que los cultivos alcanzaron una DO aproximada de 0,1 y 0,2.

Se agregó mitomicina C (MC; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a la concentración final (cf) de 0,15 y 1 µg/ml. Uno de los tubos se usó como control sin MC. Se continuó la incubación durante 6-8 hs registrando la DO cada hora. La inducción de una cepa fue detectada al decrecer la absorbancia de los cultivos que contenían MC comparados con el control sin MC.

Se centrifugó el cultivo lisado durante 15 min a 5.000 rpm, se filtró el sobrenadante a través de membranas de 0,45 µm de diámetro y se conservó a 4°C. Luego, este lisado fue evaluado por la presencia de fagos usando el método standard de doble capa (Cluzel, 1987).

Control positivo de inducción: *Lactobacillus gasser* NCK101 (cepa inducible).

Caracterización de los aislamientos que resultaron lisados durante la inducción con MC.

Preparación del inóculo, tiempo y temperatura de incubación.

Se centrifugaron 5 ml de un cultivo de activo del aislamiento bacteriano, a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó con solución fisiológica. El sedimento

se resuspendió en el volumen inicial de medio estéril y se sembró un inóculo al 2%, se incubó 5 días a 30°C en microaerofilia

Metodología convencional de identificación: pruebas metabólicas
(Bergey, 1986)

Prueba de catalasa

Se colocó una gota de agua oxigenada de 30 volúmenes sobre un portaobjetos y sobre ella, una colonia aislada de un cultivo de 24 hs, crecido en MRS agarizado.

Resultado positivo: formación inmediata de burbujas.

Resultado negativo: ausencia de burbujas.

Movilidad

Los cultivos de 18 hs fueron observados directamente al microscopio, usando iluminación reducida.

Crecimiento a distintas temperaturas

Se sembraron varios inóculos al 2% en tubos con 5 ml de caldo MRS, colocándolos en baños termostáticos a las siguientes temperaturas: 10, 45 y 50°C. Se observó el desarrollo del cultivo hasta 5 días.

Crecimiento: aparición de turbidez

No crecimiento: ausencia de turbidez

Tolerancia a 4% de NaCl

Se sembró un inóculo al 2% en medio de Facklam y Wilkinson y se incubó 5 días a 30°C.

Reacción positiva: turbidez

Reacción negativa: ausencia de turbidez

Tolerancia a 6.5% de NaCl

Se determinó (como en el caso anterior), cambiando la concentración final de NaCl, que en este caso es de 6.5%.

Crecimiento a pH 9.6

A 900 ml de caldo glucosa Lemco, se le agregaron 100 ml de solución buffer. Se ajustó el pH a 9.8 con NaOH 1 N. Se dejó toda la noche en frío para completar la precipitación y se esterilizó por filtración. Se distribuyó en tubos ocupando la totalidad de su capacidad para evitar la presencia de aire. Se sembró el inóculo al 2%. Se incubó a 30°C durante 5 días.

Reacción positiva: turbidez

Reacción negativa: ausencia de turbidez

Crecimiento a pH 9.2

Del mismo modo que anteriormente, se preparó otro medio, el cual se llevó a pH 9,2.

Test de Voges-Proskauer

A un cultivo desarrollado en medio de Clark y Lubs se le agregó 0,6 ml del Reactivo A y 0,2 ml del Reactivo B por mililitro de cultivo, agitándose bien.

Luego de agregar cada reactivo, se realizó la lectura entre los 15 y los 60 min.

Resultado positivo: aparición de color rosado

Resultado negativo: sin cambio de color

Supervivencia a 60°C

Se hizo crecer la cepa en caldo nutritivo durante 24 hs y a continuación se colocó en baño maría a 60°C durante 30 min. Se enfrió bajo agua corriente y se subcultivó en una placa de agar nutritivo, diseminándose 0,1 ml en la superficie del agar con espátula de Drigalsky. Se incubó a 30°C durante 24 hs.

Resultado positivo: desarrollo del microorganismo en esas condiciones.

Producción de CO₂ a partir de glucosa

Se mezcló la solución de MgSO₄ del medio de Gibson con la leche reconstituida, se agregó el extracto de levadura y la glucosa, luego el agar nutritivo fundido y se mezcló bien. pH 6,5.

Procedimiento: Se fundió el medio por calentamiento a 100°C y se dejó enfriar. Cuando alcanzó los 45°C se inoculó 0,5 ml de un cultivo joven, mezclándose por rotación, y se dejó coagular. Período de incubación: hasta 14 días.

Resultado positivo: producción de CO₂, lo cual se observa si hay ruptura del agar o presencia de burbujas en el medio.

Tolerancia a la bilis

Se inoculó en agar bilis un cultivo joven, se lo incubó durante 48 hs.

Resultado positivo: crecimiento

Resultado negativo: ausencia de crecimiento

Nota: 1% de bilis de buey deshidratado equivale a 10% de bilis (v/v) (para preparar 40% de Agar Bilis es necesario usar 4% de bilis de buey deshidratado).

Perfil fermentativo de azúcares

Esta prueba se llevó a cabo utilizando el sistema de identificación API 50 CHL (Bio Merieux, Marcy l'Etoile, France).

La galería API 50 CHL permite el estudio de 49 azúcares. A un cultivo en caldo MRS de toda la noche se lo centrifugó 10 min a 5.000 rpm. Las células se lavaron y resuspendieron en 2 ml de solución fisiológica estéril. Se agregaron gotas de esta suspensión a un tubo conteniendo 10 ml de agua destilada. Se leyó absorbancia a 550 nm. La lectura realizada frente a un blanco de agua destilada debe estar comprendida entre 0,5 y 0,7. Luego se agregó igual número de gotas al medio API 50 CHL y se sembró en la galería de pruebas. Se cubrió cada microcápsula con vaselina estéril para crear un ambiente de microaerofilia. Se incubó a 30°C y los resultados se observaron a las 24 y a las 48 hs.

Resultado positivo: viraje de púrpura a amarillo

Resultado negativo: sin viraje del indicador

En el caso del test de hidrólisis de la esculina (prueba N° 25) el cambio de color es de rojo a negro.

Extracción de ADN cromosómico

Se cultivaron las células en 20 ml de MRS o LAPT g durante 16 hs.

Se cosecharon las células por centrifugación y se resuspendieron en 4 ml de Buffer TES- lisozima (Sacarosa 25%, EDTA 10mM, Tris 100 mM, pH 7.5, lisozima 10 mg/ml).

Se incubó 90 min a 37°C. Se resuspendió en 1,9 ml de EDTA 20mM pH 7,0.

Se colocó 100 µl de SDS 10% y 10 µl de Proteinasa K (20 mg/ml). Se incubó durante 1 h a 55°C; periódicamente se realizaron movimientos circulares.

Se agregó 0,5 ml de perclorato de sodio 5 M y 1,2 ml de cloroformo: alcohol

isoamílico (relación 24:1).

Se colocó durante 15 min a temperatura ambiente realizando periódicamente movimientos circulares. Se centrifugó durante 10 min a 12.000 rpm.

Se transfirió la fase acuosa (capa superior) a un nuevo tubo. Se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol.

Se mezclaron, se extrajo el DNA con una varilla, se lavó en alcohol 70%.

Se dejó secar en un tubo Eppendorf con el DNA hacia arriba en la varilla.

Se colocaron 200 μ l de agua destilada para PCR en el tubo, dejando el DNA sumergido.

Se guardó a 4°C para sembrar un gel de agarosa al 0,75% para observar el DNA cromosómico.

Reacción de polimerasa en cadena (PCR) a partir del ADN celular

Previo a la reacción, el ADN celular se trató con 1 vol de perclorato de sodio y precipitó en presencia de 1 vol de isopropanol. Luego de centrifugar a 14.000 rpm, se lavó el ADN con etanol 70%, se dejó secar a temperatura ambiente, y se resuspendió en buffer TE.

Reacción de PCR:

Para un volumen de reacción final de 25 μ l, se mezcló:

ADN templado 0,3 mg/ml 1.0 μ l

Primers 10 μ M 2.5 μ l cada uno

MgCl₂ 25 mM 2.5 μ l

Buffer 10X 2.5 μ l

Taq Polimerasa 5U/ μ l 0.2 μ l

dNTP 2.5 mM 1.0 μ l

H₂O (c.s.p. 25 µl) 15.3 µl

Se amplificó en un termociclador Perkin Elmer según el siguiente programa:

Reacción de PCR:

Programa de procesamiento 1 (1 ciclo), 2 (30 ciclos), y 3 (1 ciclo)

1	Desnaturalización	94°C	5 min
2	Desnaturalización	94°C	15 seg
	Unión del primer (Annealing)	50°C	30 seg
	Extensión	72°C	45 seg
3	Extensión	72°C	10 min

Finalizada la reacción de PCR, se procedió a analizar los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% (p/v) en buffer TAE 1X a 65 voltios durante 2 hs, se tiñó el gel con bromuro de etidio (0,5 ug/ml) y se fotografió.

Binding buffer:

NaClO₄ 6M
Tris 50 mM pH 8
EDTA 10 mM pH 8
Etanol 50% v/v

Wash buffer

NaCl 10 mM
Tris 20mM pH 7,5
EDTA 9 mM pH 7,5

Identificación de los amplicones

Por otro lado, el fragmento amplificado fue aislado, purificado a partir del gel de agarosa y secuenciado en BioResource (NY, USA). Las secuencias fueron

comparadas con aquellas reportadas en la base de datos usando el software Clustal X.

Microscopía electrónica de las cepas tratadas con MC y de los lisados

Esta técnica fue realizada por el Dpto. de Servicios de Microscopía Electrónica, Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), CONICET-UNT.

A las 3 hs luego del agregado de mitomicina C, se extrajo una muestra del cultivo, se centrifugó y se filtró. La muestra fue fijada en una solución de glutaraldehído en buffer fosfato 0,1M pH 7,4 con la adición de CaCl_2 1mM y luego fijada en tetróxido de osmio con el mismo buffer durante toda la noche. El pellet fue incluido en una solución de agar al 2%.

La muestra fue luego tratada con una solución acuosa de uranil acetato al 2% por 40 min. Luego de la fijación, la muestra fue gradualmente deshidratada en alcohol a concentraciones crecientes, luego en acetona y embebida en resina Spun.

Las secciones ultrafinas gris plata fueron teñidas con acetato de uranilo y Citrato de plomo y examinadas con un microscopio de transmisión Zeiss EM 109 .

Aquí se observó el efecto de la inducción con mitomicina C sobre la morfología del huésped.

Los lisados se enviaron al laboratorio del departamento de Biología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Laval de Quebec, Canadá (Ackermann) para observar la morfología de los fagos.

Extracción del ADN de fagos (Sambrook y col, 1989)

Se agregó un volumen de fenol saturado en TRIS pH= 8,0 a la suspensión de fagos.

Se mezcló por inversión y centrifugó 10 min a 4°C 13.000 rpm.

Se extrajo la parte superior y se repitió 2 veces el tratamiento con fenol.

Se tomó la fase superior y se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).

Se mezcló por inversión y se centrifugó a 4°C 10 min a 13.000 rpm.
 Se extrajo la parte superior y se agregó 1/10 volumen de NaAc 3M, pH=4.8 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto ó 0,8 volumen de isopropanol.
 Se dejó precipitar a -20°C durante un período mayor a 1 h.
 Se centrifugó durante 10-15 min a 13.000 rpm.
 Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en etanol al 70%.
 Se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min en centrifuga refrigerada .
 Se descartó el sobrenadante, invirtiendo el microtubo sobre papel absorbente hasta secar el precipitado.
 Se resuspendió el precipitado (ADN) en un pequeño volumen de TE, acorde a la cantidad de ADN.

Digestión del ADN fágico con enzimas de restricción (Sambrook y col,1989 modificado en CERELA)

Se colocó la solución de DNA en un tubo Eppendorf. Se agregaron 2 µl de buffer apropiado para cada enzima, luego 0,5 µl de seroalbúmina bovina.
 Se adicionó un volumen suficiente de agua para llegar a un volumen final de 20 µl.
 Se agregó 1 µl de la enzima de restricción.
 Se mezcló e incubó a la temperatura adecuada a cada enzima.
 Se detuvo la reacción agregando EDTA 0,5 M (pH 8) a una concentración final de 10 mM y se guardó a -20°C hasta su análisis por electroforesis en geles de agarosa.

Enzimas de restricción usadas en este trabajo: *EcoRI*, *HaeIII*, *XbaI*, *EcoRV*, *HindIII* (Boehringer).

<u>Enzima</u>	<u>Buffer</u>
<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI</i>
<i>EcoRV</i>	3+BSA
<i>HaeIII</i>	2
<i>HindIII</i>	E
<i>XbaI</i>	2+BSA

Marcador de PM: 1 kb ladder (Bio-Labs)

Las enzimas usadas son de los laboratorios Promega y Bio-Labs.

Luego de la electroforesis en gel de agarosa, la suma de los fragmentos de restricción fue promediada y usada para calcular el tamaño en kilobases de los fagos.

Electroforesis de ADN en geles de agarosa (Sambrook y col, 1989)

Se analizó el ADN (20 μ l de muestra) por electroforesis en gel de agarosa (0,8%) en un tampón TAE constituido por: Tris-acetato 40 mM, EDTA 2mM. Condiciones de corrida : 78 voltios durante 1 – 1 1/2 hs.

Al término de la corrida electroforética, se coloreó el gel en tampón TAE conteniendo 1 μ g/ml de bromuro de etidio durante 15 min .

Para visualizar el gel se utilizó un transiluminador de luz UV (250 nm) y fotografió con una cámara Polaroid MP-4, con filtro naranja y con película positiva Polaroid 667 de alta sensibilidad.

Se promedió la suma de los fragmentos de restricción para aproximarse al tamaño (en kilobases) del DNA de fagos.

Detección de cepas indicadoras (sensibles al fago, que forman placas de lisis) por el Método de la Gota

Se filtraron los lisados obtenidos luego de la inducción con mitomicina C con filtros esterilizantes. Las cepas bajo estudio fueron testeadas por su sensibilidad al lisado por el método de Cluzel et al, 1987. El bacteriófago fue detectado por las placas de lisis que produjo en la técnica de doble capa de agar. Para ello se inoculó al 2%, 200 μ l de la cepa indicadora en 5 ml de agar blando MRS-Ca⁺².

Se homogeneizó y volcó sobre una capa de MRS-Ca agar duro. Se dejó solidificar 15-30 min. Se agregaron 10 μ l de la suspensión de bacteriófagos. Se dejó secar y se incubó 24 hs a 37°C. Se observó la formación de halos de lisis (placas). En la ausencia de placas de lisis, el cultivo fue reinoculado en medio fresco. La cepa se consideró insensible cuando no se detectaron placas en 3 subcultivos sucesivos.

Detección de cepas indicadoras en medio líquido

La lisis fue además testeada en medio líquido. Para ello se inocularon 2 tubos de caldo MRS-Ca⁺² con la cepa al 1%.

Se agregó lisado o dilución apropiada al 5% a uno de los tubos. Se dejó un control sin inocular. Se incubó a 37°C. Se examinaron visualmente los tubos a intervalos regulares.

En caso de ausencia de lisis, tan pronto como la turbidez se hizo visible en el control, se transfirieron ambos, control y "lisados", al 2% en medio fresco. En caso de ser necesario, se hizo una tercera transferencia.

La lisis por fagos puede ser detectada en estas condiciones, aun cuando ocurre lentamente, especialmente cuando las partículas de fagos no son muy activas o son pequeñas en número.

D. RESULTADOS Y DISCUSION

D. Resultados y Discusión

D.1. Aislamiento y caracterización de bacterias lácticas

Se procesaron las siguientes muestras, aisladas a partir de distintas zonas del sur de la Provincia de Córdoba y el Noroeste de la Provincia de San Luis: 2 quesos de pasta dura, 8 quesos de pasta blanda, 5 sueros fermento, 7 lactosueros, y 2 muestras de leche cruda.

De esas muestras se obtuvieron 91 aislamientos, los cuales se conservaron para el estudio de su estado lisogénico.

Los aislamientos seleccionados presentaron las siguientes características, que se corresponden a las de bacterias lácticas:

Movilidad (-)

Catalasa (-)

Reducción de NO_3 (-)

Gram (+)

Indol (-)

D.2. Estudio del estado lisogénico de los aislamientos

Las técnicas empleadas para estudiar la lisogenia en cepas de bacterias lácticas fueron:

- Inducciones de profagos con mitomicina C.
- Método de la gota para determinar la presencia de fagos en los lisados y detectar cepas sensibles.

D.3. Inducción de los fagos a ciclo lítico con mitomicina C (MC)

En este estudio se evaluó el estado lisogénico de los aislamientos de bacterias lácticas obtenidos de muestras de leche cruda, quesos y sueros fermento de la zona Sur de la Provincia de Córdoba, según las condiciones de inducción descritas por Cluzel y col (1987).

Los 91 aislamientos fueron probados por su inducción con 2 concentraciones de MC (0,15 -1 µg MC/ml).

Sólo 2 cepas aisladas a partir de quesos (K3 y 12Q3) resultaron inducidas a las 2 concentraciones de MC probadas (0,15 y 1 ug/ml. La frecuencia obtenida coincide con los datos reportados por Carminati y col (1992) quienes describieron una cepa inducible por mitomicina C de 45 cepas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

En la figura 4 se muestra la clarificación de los cultivos inducidos con MC comparados con el cultivo control. El cultivo control corresponde a *Lactobacillus gasserí* NCK 101 , cepa que ha probado ser sensible a distintas concentraciones de mitomicina C.

Se observó lisis de ambos cultivos con ambas concentraciones de mitomicina, siendo la óptima de 1ug/ml. A esta concentración, las cepas 12Q3 y K3 crecieron a una velocidad similar a la del cultivo control durante las primeras dos horas posteriores a la adición de la mitomicina; ésto fue seguido por un decrecimiento en la densidad óptica, y la lisis fue completa luego de 2-3 hs.

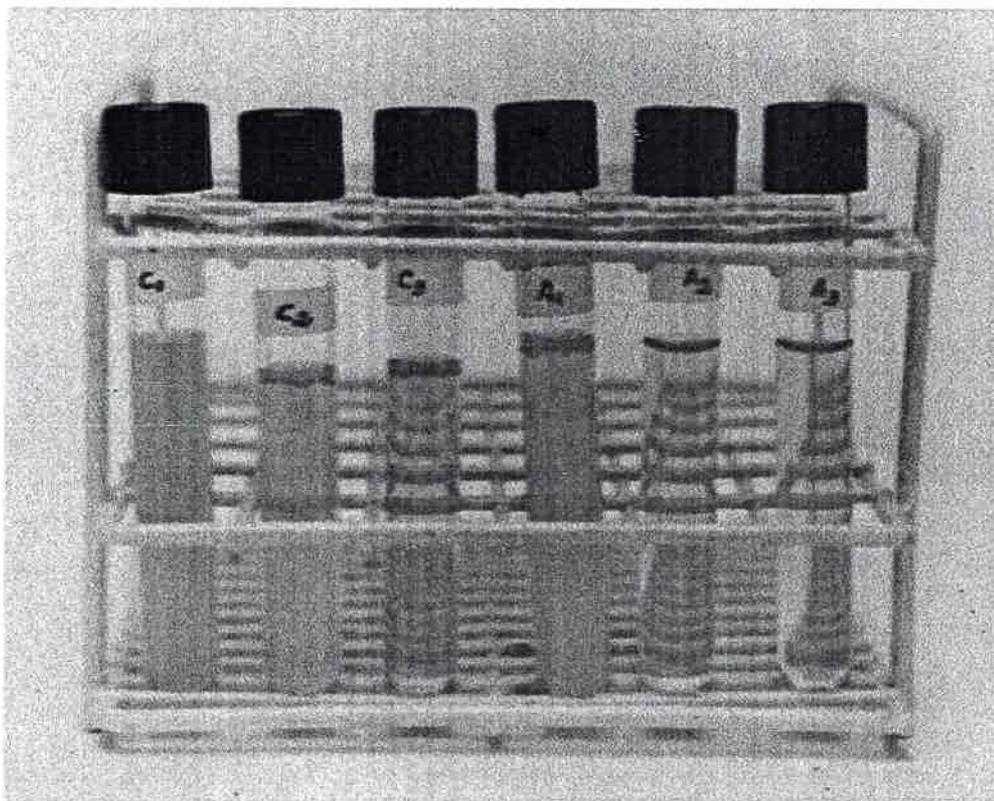


Figura 4: Inducción a lisis con MC en las cepas control y 12Q3.

C₁: cepa control (*Lactobacillus gasseri* NCK 101) sin MC; C₂: cepa control con MC (conc. 0,15 ug/ml); C₃: cepa control con MC (conc. 1 ug/ml)

A₁: cepa 12Q₃ control sin MC; A₂: cepa 12Q₃ con MC (conc. 0,15 ug/ml); A₃: cepa 12Q₃ con MC (conc. 1 ug/ml)

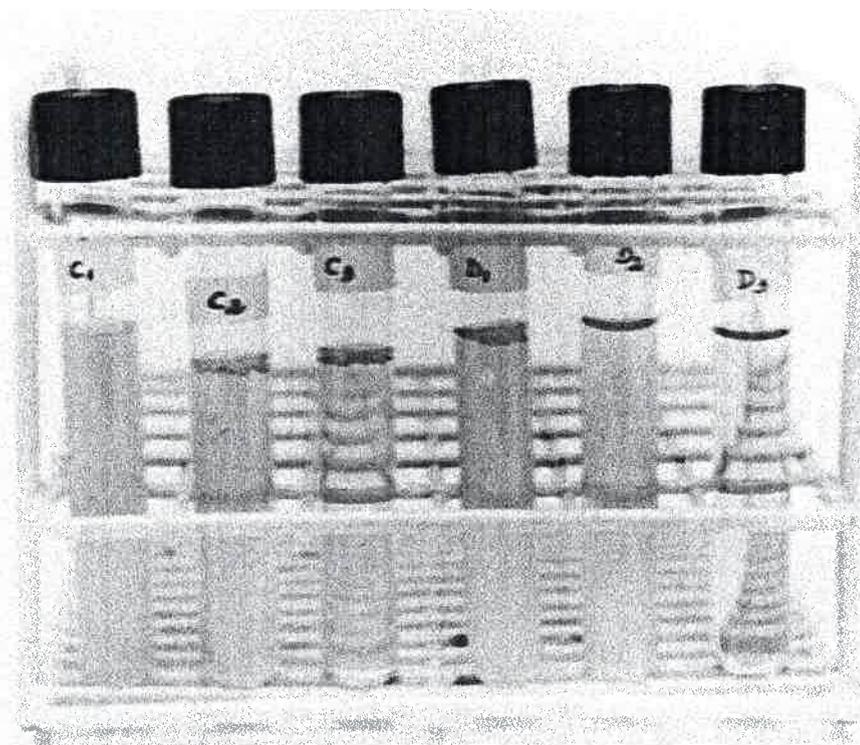


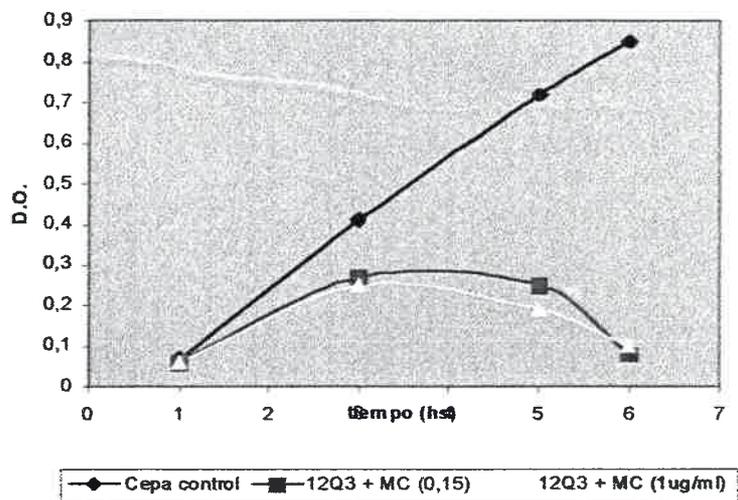
Figura 5: Inducción a lisis con MC en las cepas control y K₃.

C₁: cepa control (*Lactobacillus gasseri* NCK 101) sin MC; C₂: cepa control con MC (conc. 0,15 ug/ml); C₃: cepa control con MC (conc. 1 ug/ml)

D₁ : cepa K₃ control sin MC; D₂ : cepa K₃ con MC (conc. 0,15 ug/ml); D₃ : cepa K₃ con MC (conc. 1 ug/ml)

La cinética de estos cultivos en presencia y ausencia de MC se muestra en la figura 6. Como se observa, la cepa 12Q3 presentó una cinética de crecimiento normal dentro de las 3 hs. post-inducción con MC, mostrando luego una inhibición en su crecimiento con ambas concentraciones de MC ensayadas. La cepa K3 disminuyó también su crecimiento luego de las 3 hs post inducción, aunque únicamente con 1 ug/ml de MC.

A



B

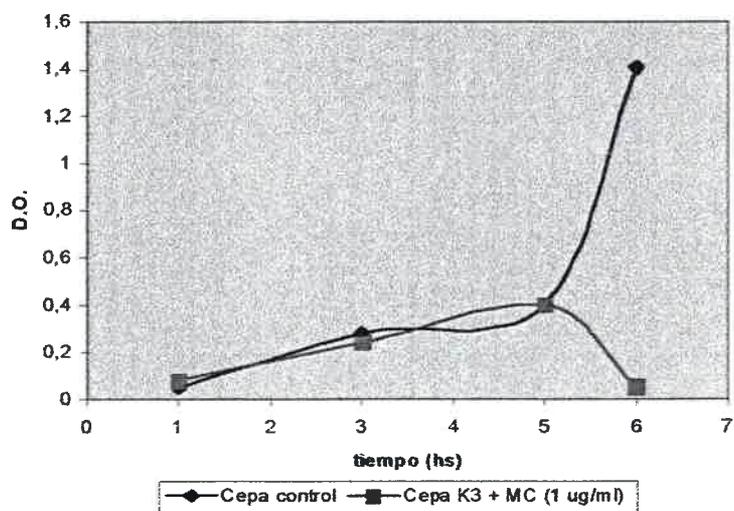


Figura 6. Cinética de crecimiento de la cepa 12Q₃ (A) y K₃ (B) posterior a la adición de mitomicina C (0,15 y 1 ug/ml)

D.4. Identificación taxonómica:

D.4.A. Métodos convencionales.

Las dos cepas fueron identificadas por métodos convencionales mediante la determinación de características fisiológicas, pruebas metabólicas y perfil fermentativo de azúcares (Facklam, 1989).

La tabla 3 muestra los resultados obtenidos a partir del análisis de los dos aislamientos con relación a las características fisiológicas y pruebas metabólicas. El comportamiento de las 2 cepas con relación a la fermentación de las diferentes fuentes carbonadas se muestra en la tabla 4.

Las dos cepas fueron identificadas como pertenecientes al género *Enterococcus* según Bergey et al, 1986, Cowan et al, 1995, Haba, 1992, Holt et al, 1994.

Los perfiles de fermentación permitieron identificar a ambas cepas como *Enterococcus durans*.

PRUEBA	12Q3	K3
Coloración de Gram	+	+
Morfología	Cocos ovoides en cadenas cortas	Cocos ovoides en cadenas cortas
Catalasa	-	-
Movilidad	-	-
Esporas	-	-
Crecimiento a 10°C	+	+
Crecimiento a 45°C	+	+
Crecimiento a 50°C	-	-
Crecimiento en 2% NaCl	+	+
Crecimiento en 4% NaCl	+	+
Crecimiento en 6,5% NaCl	+	+
Crecimiento a PH 9,2	+	+
Crecimiento a PH 9,6	+	+
Prueba de Gibson	-	-
Oxidasa	-	-
Nitrato reductasa	-	-
Voges Proskauer	+	+
Sobrevida a 60°C, 30 min	+	+
Crecimiento en 40% de bilis	+	+

Tabla 3: Características fisiológicas y pruebas metabólicas determinadas en las cepas 12Q3 y K3

AZUCAR	12Q3	K3	AZUCAR	12Q3	K3
Eritritol	-	-	Salicina	+	-
D-arabinosa	-	-	Maltosa	+	-
L-arabinosa	-	-	Lactosa	+	-
Glicerol	-	-	Esculina	+	-
Ribosa	+	+	Melibiosa	-	-
D-xilosa	-	-	Sacarosa	-	-
L-xilosa	-	-	Trealosa	+	+
Adonitol	-	-	Inulina	-	-
β -metil-xilósido	-	-	Melezitosa	-	-
Galactosa	+	+	D-rafinosa	-	-
D-glucosa	+	+	Almidon	-	-
D-fructosa	+	+	Glicógeno	-	-
D-manosa	+	+	Xilitol	-	-
L-sorbosa	-	-	β -gentiobiosa	+	+
Ramnosa	-	-	D-turanosa	-	-
Dulcitol	-	-	D-lisosa	-	-
Inositol	-	-	D-tagatosa	+	+
Manitol	-	-	D-fucosa	-	-
Sorbitol	-	-	L-fucosa	-	-
α -metil-d-manósido	-	-	D-arabitol	-	-
α -metil-d-glucosido	-	-	L-arabitol	-	-
N-acetil-glucosamina	+	+	Gluconato	-	-
Amigdalina	-	-	2-ceto-gluconato	-	-
Arbutina	-	-	5-ceto-gluconato	-	-

(+) Fermentación ; (-) No fermentación

Tabla 4: Perfil fermentativo de azúcares de las cepas 12Q3 y K3.

D.4.B. Métodos moleculares.

Para confirmar la identificación de ambos aislamientos como *Enterococcus durans* se determinó la secuencia de ADNr 16S, según Monstein et al, 1998; Patel, 1998; Kullen, 2000; Knijff, 2001; Cuozzo, 2002.

Para ello se realizó la amplificación del ADN por PCR mediante el empleo del ADN total de ambas cepas como templado y de un cebador correspondiente al ADNr 16S de *Enterococcus durans*.

La figura 7 muestra el ADN total de las células que sirvió como templado en la reacción de PCR, pudiendo observar la pureza del ADN de ambas cepas y que no se encuentra degradado.

El amplicón que corresponde a la región variable V1 del 16S rADN fue purificado y enviado a secuenciar por métodos standar (Sanger, 1997), al Departamento de Biología Médica, Facultad de Medicina, Laval, Universidad de Quebec, Canadá (Dr. Ackermann). Las secuencias fueron comparadas con las reportadas en la base de datos usando el software Clustal W.



Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del ADN de las cepas 12Q3 y K3. calle 1: marcador de peso molecular, calle 2: DNA de la cepa 12Q3, calle 3: DNA de la cepa K3.

D.5. Secuencias editadas de los fragmentos amplificados

En las Figuras 7 y 8 se muestra la homología entre las secuencias en estudio y su comparación con cepas de enterococos de colección (*Enterococcus faecium* strain DSM20477; *E. durans* DMS20633; y *E. hirae* DMS20160).

Los resultados permitieron confirmar que las cepas aisladas pertenecen al género *Enterococcus*. La cepa 12Q3 muestra una identidad del 98% con las tres cepas tipo de enterococos (*E. faecium*, *E. durans* and *E. hirae*), mientras la identidad de la cepa K3 con la misma cepa tipo es sólo del 89%. Es importante resaltar que la secuencia de la cepa K3 no pudo ser optimizada. A partir de las secuencias de ADNr 16S, resulta difícil discriminar si la cepa 12Q3 es *E. faecium* o *E. durans*.

ADNr 16S, resulta difícil discriminar si la cepa 12Q3 es *E. faecium* o *E. durans*. Como se muestra en la Figura 8, las secuencias DNAr 16S de las tres cepas tipo difieren en cuatro posiciones, indicadas con números ("superscript") en la secuencia ADNr 16S de 12Q3. De esta manera, la secuencia de 12Q3 difiere en una base con la secuencia de *E. faecium* (posición ²); en dos bases con la secuencia de *E. durans* (posiciones ¹ y ³), y en tres bases con la secuencia de *E. hirae* (posiciones ², ³ y ⁴). Un análisis similar con la secuencia de la cepa K3 sería en este momento prematuro.

GGCGTGCCTAATxCATGCAAGTCGA¹ACGCCTCTTTTTCCCCGGAGCTTGCTC
 CACCGGAAAAAGAA²GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC
 CCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCA
³AACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGG
 ACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCC⁴ACGA
 TGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGC
 CCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGT
 CTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCT
 GTTGTTAGAGAAGAACAAGGATxAGAGTAxCTGTTCATCCTxxTACGG

x: base ausente en la secuencia de 12Q3, y presente en las tres cepas tipos.

Los números indican la posición donde las secuencias de las tres cepas tipo difieren:

A¹: *E. hirae*, *E. faecium*, y 12Q3; T: *E. durans*

A²: *E. durans* y 12Q3

A³: *E. faecium* y 12Q3

C⁴: *E. durans*, *E. faecium* y 12Q3

Figura 8. Secuencia de bases de la región variable V1 del ADNr 16S de la cepa 12Q3 (457 nt; secuencia primer PL 5' → 3')

Secuencias homólogas:

gi|8980342|emb|AJ276355.1|EFA276355 *Enterococcus faecium* 16S rRNA gene, strain DSM20477

Length = 1533

Expect = 0.0 Identities = 448/455 (98%), Gaps = 4/455 (0%)

>gi|8980341|emb|AJ276354.1|EDU276354 *Enterococcus durans* 16S rRNA gene, strain DSM20633

Length = 1534

Expect = 0.0 Identities = 448/455 (98%), Gaps = 4/455 (0%)

gi|8980343|emb|AJ276356.1|EHI276356 *Enterococcus hirae* 16S rRNA gene, strain DSM20160

Length = 1535

Expect = 0.0 Identities = 447/455 (98%), Gaps = 4/455 (0%)

GTAAGGGATGAACAAGTNCTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAACAAACACGAG
TTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCANGA
CTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTG
GGCCGNGTCTNAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATG
CATCCGTNGNCTTGGTGAGTCNTTACCTCACCAATNANCTAATGTACCN
TGGGTCCATCCATTATCNACACCCNNAAGTGCTTTCNANANTAAAATCAT
GCGGTTTCGATCAGATANACAGGTCAGGNGCACCNGCTTCCANNCNATCN
TNCTTTTCNGANGGGANGNTCANCNCCACTTNTTTANTCGAAAACCCAT
TCCCNCTTTCTTCTTNTTGGGGNGCTTNCCTTCNACCAANGCAAAAA
CAANCTNCCTNC

- La base "N" indica la incertidumbre de la base implicada, dado que la reacción de secuenciamiento no logró identificar la base correspondiente.

Figura 9. Secuencia de bases de la región variable V1 del ADNr 16S de la cepa K3 (462 nt; secuencia primer PL 5' → 3')

Secuencias homólogas:

>[gij8980341|emb|AJ276354.1|EDU276354](#) Enterococcus durans 16S rRNA gene, strain DSM20633

Length = 1534

Expect = 1e-95 Identities = 277/309 (89%), Gaps = 4/309 (1%)

>[gij8980342|emb|AJ276355.1|EFA276355](#) Enterococcus faecium 16S rRNA gene, strain DSM20477

Length = 1533

Expect = 1e-95 Identities = 277/309 (89%), Gaps = 4/309 (1%)

>[gij8980343|emb|AJ276356.1|EHI276356](#) Enterococcus hirae 16S rRNA gene, strain DSM20160

Length = 1535

Expect = 1e-95 Identities = 277/309 (89%), Gaps = 4/309 (1%)

D.6. Microscopía electrónica de las células huésped.

Las cepas 12Q3 y K3 fueron tratadas con mitomicina C a las 3 hs post-siembra del inóculo para inducir la lisis de los cultivos. Se prepararon cortes para su observación por microscopía electrónica de transmisión (servicio realizado en la Universidad Nacional de Tucumán), para observar el efecto de la inducción con MC sobre la morfología de la célula huésped.

En la figura 10 se observan células bacterianas normales no lisadas de cultivo de la cepa 12Q3 sin inducción por MC. (cultivo control), mientras que en la figura 11 se observan células bacterianas no lisadas y células lisadas, así como también células septadas de cultivo de la cepa 12Q3 inducidas con MC.

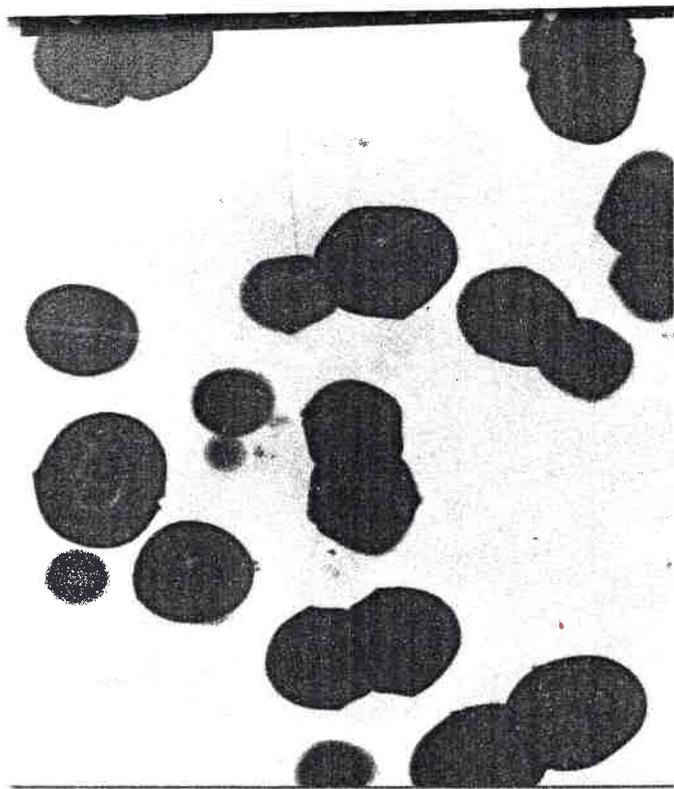


Figura 10. Microscopía electrónica de transmisión de células de la cepa 12Q3 en cultivos sin la inducción por mitomicina C (cultivo control).



Figura 11. Microscopía electrónica de transmisión de células no lisadas (oscuras) y lisadas (claras) de la cepa 12Q3 de un cultivo adicionado con mitomicina C con una magnificación de 4960x.



Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión de células septadas de la cepa 12Q3 de cultivo adicionado con mitomicina C (82640x).

Del análisis de los cortes de microscopía electrónica de transmisión se puede observar que las células que mantienen una replicación activa del fago forman septos y algunas se lisan.

En investigaciones realizadas por Follet y col. (1967) y Spasova (1973) se reportó el aislamiento y caracterización de fagos de enterococos y su detección por microscopía de transmisión.

Los lisados obtenidos post-inducción se enviaron al laboratorio del departamento de Biología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Laval de Quebec, Canadá (Dr.Ackermann).

En este estudio no fue posible obtener fotografías de bacteriófagos en los lisados enviados posiblemente porque el número de partículas fue bajo, menor al límite de detección del microscopio electrónico.

D.7. Caracterización parcial de los bacteriófagos aislados

Con el objetivo de determinar si los fagos detectados son similares y definir aproximadamente el tamaño del genoma viral, el ADN fágico fue caracterizado mediante cortes con enzimas de restricción y posterior resolución electroforética en un gel de agarosa (Figura 13).

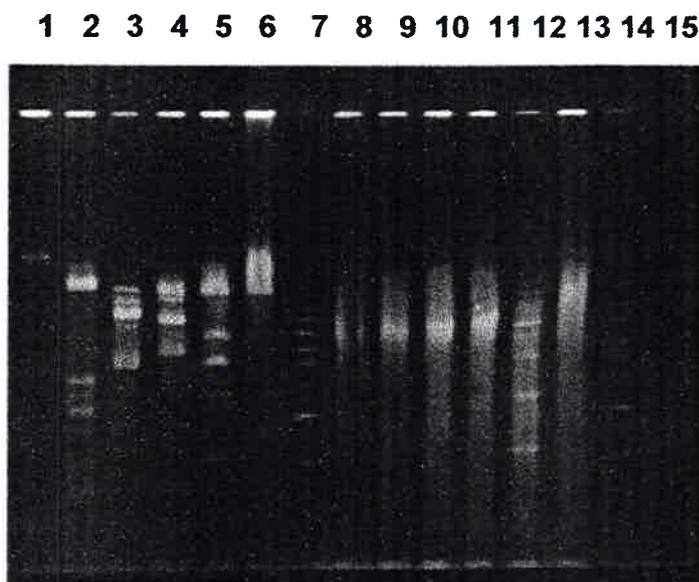


Figura 13. Perfiles de restricción del ADN de los fagos aislados de las cepas 12Q3 y K3 por corte con enzimas de restricción en gel de agarosa.

Calles 1 y 7: Marcador de peso molecular (1 kb ladder) ;Calles 2 a 6: fago aislado de la cepa 12Q3 (ϕ 12Q); Calles 9 a 13: fago aislado de la cepa K3 (ϕ K3); Calles 3 y 12: Corte con Eco R I; Calles 4 y 11: Corte con Xba I; Calles 6 y 13:Corte con Eco R V; Calle 14: ADN cromosomal cepa 12Q; Calle 15: ADN cromosomal cepa K3; Calles 2 y 9: Control sin cortar

Los resultados muestran que los fagos ϕ 12Q y ϕ K3 presentan distintos perfiles de restricción por corte con la enzima *EcoRI*. El ADN de ϕ K3 no presenta cortes con las otras enzimas (*Xba I* y *Eco RV*). Se podría especular que este resultado podría

deberse a la acción de inhibidores sobre el ADN. Por otro lado, el peso molecular aproximado de los fragmentos de ADN obtenidos por corte con enzimas de restricción es de 37.5 kilobases (kb) para el fago ϕ 12Q3 y de 52 kb para el fago ϕ K3 (tabla 6).

A partir del análisis de los resultados obtenidos, se podría considerar que los dos fagos aislados son diferentes teniendo en cuenta las diferencias presentadas en el peso molecular y los sitios de corte del ADN de ambos fagos.

Es de destacar que el hecho de haber logrado detectar en el lisado, luego de la concentración mediante polietilenglicol y NaCl, una molécula de ADN que genera fragmentos discretos después de ser tratada con enzimas de restricción, indica que la lisis celular fue debida a inducción de un fago temperado.

Fago ϕ 12Q3			Fago ϕ K3	1 kb
Eco RI	Xba I	Eco RV	Eco RI	ladder
15-18	15-18	15-18	18	10
8	10	4	15	8
5	5,5	3	8	8
3,6	2,8	2,5	5	5
3,2	2,4	2	3,5	4
2,5	2,2	2	2,5	3
_____	_____	_____	_____	2,5
*37-40	*38-48	*31-36	*52	2

* Peso molecular total aproximado

Tabla 5. Peso molecular (kb) aproximado de los fragmentos de ADN de los fagos ϕ 12Q3 y ϕ K3 por corte con las enzimas de restricción Eco RI, Xba I y Eco RV.

D.8. Detección de cepas indicadoras por el método de la gota

En este trabajo se evaluó el rango de huésped de los fagos ϕ 12Q3 y ϕ K3 frente a 6 cepas de *Enterococcus durans* de la colección de CERELA .

La ausencia de placas de lisis, en medio sólido, o reducción de la densidad del cultivo, en medio líquido se debería al limitado rango de huésped presentado por los bacteriófagos..

La inmunidad a la superinfección podría ser otra explicación a la ausencia de placas de lisis.

D.9. Microscopía electrónica de los fagos

Se realizó la microscopía electrónica del lisado, pero no se pudo identificar material viral, probablemente por la escasa cantidad de partículas identificadas en ese estadio del crecimiento celular. Los datos coincidirían con la escasa ruptura celular observada en la figura 11.

E. CONCLUSION Y PROYECCIONES

E. Conclusión y Proyecciones

De las 91 cepas de bacterias lácticas de productos lácteos regionales probadas por su inducción con mitomicina C, solamente 2 de ellas resultaron positivas (2%) en las concentraciones de MC probadas, resultando por lo tanto, 2 cepas lisogenizadas.

Estos hallazgos pueden representar una subestimación del número de cepas lisogenizadas, ya que no todos los fagos temperados se inducen a lisis por MC, o bien, las concentraciones utilizadas no fueron las óptimas para otros fagos.

Se caracterizaron las cepas por pruebas fisiológicas y perfil fermentativo de azúcares. Además, se realizó la amplificación y secuenciamiento de su V1 16S RNA. Ambas cepas fueron identificadas como como *Enterococcus durans* por la metodología tradicional y confirmadas por reacción de secuenciamiento.

Se determinó un perfil de restricción de los fagos aislados y se estimó su peso molecular. Los fagos aislados resultaron diferentes considerando los distintos tamaños de fragmentos de restricción obtenidos y diferentes pesos moleculares. El análisis de sus partículas no permitió su observación por microscopía electrónica de transmisión, pudiendo especular que la selectividad de los virus con relación a sus huéspedes podría dar cuenta de la imposibilidad de determinar el rango de huésped.

En la actualidad, la bibliografía muestra que han sido descriptos muy pocos fagos de enterococos a nivel molecular, de manera que este trabajo es relevante considerando que se han aislado y caracterizado parcialmente dos nuevos fagos de *Enterococcus durans*.

El estudio de los fagos contribuirá en un futuro a:

-Aportar información sobre el origen de fagos líticos que afectan las fermentaciones lácticas, lo que podría reducir o eliminar las infecciones de los fermentos.

-Utilizar el DNA de los fagos como sondas genéticas para evaluar su diseminación en otras células que pueden ser utilizadas como base para el desarrollo de potenciales fermentos.

-Profundizar el estudio de los fagos aislados para ser usados como posibles vectores genéticos de clonado, de expresión, de integración o de transducción.

A modo de cierre, podríamos concluir citando las palabras de Sozzi (Sozzi, 1994): "Los fagos representan una constante que siempre debemos tener presente en un proceso fermentativo".

Se acepta que los fagos siempre están presentes donde existe un desarrollo microbiano y, por lo tanto, también están en la industria lactocasearia. Si no se puede realizar una acción preventiva y de control sobre los fagos es probable que aparezcan problemas en la producción y daños o anormalidades en los productos. Para poder afrontar el problema es necesario realizar un profundo estudio del fenómeno. **Es importante aprender a convivir con el fenómeno de los bacteriófagos**".



F. BIBLIOGRAFIA

F. Bibliografía

Ackermann H.W. 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Arch. Virol.* 146: 843-857.

Ackermann H.W. and DuBow M.S. 1987. *Viruses of prokaryotes 1 y 2.* CRC Press, Boca Ratón.

Ackermann H.W. and Eisenstark A. 1974. The present stage of phage taxonomy. *Interviol.* 3:201-219.

Auad L, Ruiz Holgado A.P. de, Forsman P., Alatossava T. , Raya R.R. 1997. Isolation and characterization of a new *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* temperate bacteriophage. *J. Dairy Sci.* 80: 2706-2712.

Auad L., Azcárate Peril M:A., Pesce de Ruiz Holgado A., Raya R.R. 1998. Evidence of a Restriction/Modification system in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326. *Current Microbiol.* 36: 271-273.

Avaniss-Aghjani, K.,K. Jones,D.Chapman,and C.Brunk.1994. A molecular technique for identification of bacteria using small subunit rRNA sequences.*Biotechniques* 17:144-146.

Bergey's Manual of systematic Bacteriology. 1986.Vol. I. Ed. Williams and Wilkins.

Bergh, Ø., K. Y. Børsheim, G. Bratbak, and M. Heldal. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340:467-468

Bradley D.E. 1967. A review: Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 31: 230-314.

Brussow,H., and R.W. Hendrix .2002. Phage genomics: small is beautiful. *Cell* 108:13-16.

Cairns, J., G. S. Stent, and J. D. Watson. 1992. *Phage and the origins of molecular biology*, expanded ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.

Carminati D., Giraffa G. 1992. Evidence and characterization of temperate bacteriophage in *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* St 18. *J. Gen. Microbiol.*59: 71-79.

Centeno J., Menéndez S., Rodríguez-Otero J. 1996. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's milk cheese (Northwest Spain). *Int. J. Food Microbiol* 33:307-313.

Clark W., Reinbold G. 1966. Enterococci in young cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 49: 1214-1218.

Cluzel P.J., Veaux M., Rousseau M. and Accolas J.P. 1987. Evidence for temperate bacteriophages in two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Res.* 54: 397-405.

Colin Hill. 1993. Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Reviews.* 12: 87-108.

Coetzee J.N., de Klerk H.C. Lysogeny in the genus *Lactobacillus*. 1962. *Nature* 194:505.

Coppola S., Parente E. Dumontet S., La Peccerella A. 1988. The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. *Lait* 68: 295-310.

Cowan and Steel's. 1995. Cap. 6. Characters of gram-positive bacteria. P.50-93. In *Manual for the identification of Medical Bacteria*. Ed. Barrow, G and Felthman, R. 3° Ed. Cambridge University Press. Great Britain.

Cuozzo S., 2002. Estudios genéticos de lactocina 707, una bacteriocina producida por *Lactobacillus casei* CRL 705. Tesis doctoral. CERELA.

Chopin M., Rouault A., Rousseau M. 1983. Elimination of a prophage in mono- and multilysogenic strains of group N streptococci. *Lait* 63: 102-115.

Danovaro, R., A. Dell'Anno, A. Trucco, M. Serresi, and S. Vanucci. 2001. Determination of virus abundance in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1384-1387.

Danovaro, R., and M. Serresi. 2000. Viral density and virus-to-bacterium ratio in deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1857-1861.

Daily Ch., Fitzgerald G., Davis R. 1996. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:99-110.

Davidson B., Kordias N; Dobos M; Hillier A. 1996. Genomic organization of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:161-183.

De Man J, Rogosa M, Sharpe M. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23:130-155.

de Vos W. 1989. On the carrier state of bacteriophages in starter lactococci: an elementary explanation involving a bacteriophage resistance plasmid. *Neth. Milk Dairy J.* 43: 221-227.

Douglas J. 1978. *Bacteriófagos*. Ed. Omega, S.A. Barcelona.

Elliker P., Anderson A., Hannesson G. 1966. An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *J. Dairy Sci.* 39: 1611-1612.

Facklam R., Collins M. 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27:731-734.

Follet E. 1967. *J. Gen. Virol.* 1: 281-84.

Fons M., Gomez A., Karjalainen T. 2000. Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2 (Suppl.): 240-246.

Follet E. 1967. An electron microscope study of a streptococcal bacteriophage. *J. Gen. Virol.* 1: 281-84.

Franckii R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D.L. and Brown F. (eds). 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, Wien New York, Arch. Virol. Suppl 2: 159-166.

Franz C., Holzappel W., Stiles M. 1999. Enterococci at the cross-roads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 47: 1-24.

Freitas A., Pais C., Malcata F., Hogg T. 1995. Microbiological characterization of Picante de Beira Baixa cheese. *J. Food Prot.* 59: 155-160.

Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365-378.

Gardiner G., Ross R. 1999. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese. *J. Agric. Food. Chem.* 47: 4907-16.

Gelsomino R., Vancanneyt M., Cogan T., Swings J. 2003. Effect of raw-milk cheese consumption on the enterococcal flora of human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 312-319.

Giraffa G., Domenico C., Neviani E. 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.* 60: 732-738.

Haggblade S. and Holzapfel W.H. 1989. Industrialization of Africa's indigenous beer brewing. In: K.H. SteinKraus (editors), *Industrialization of indigenous fermented foods*. Marcel Dekker, New York, p191-283.

Haba H. And Pérez D. 1992. Sección 12. Cocos Gram positivos. En *Sistemática Bacteriana*. 3° Ed. Copión. Valencia. España.

Hendrix, R.W., 2002. Bacteriophages: evolution of the majority. *Theoret. Popul. Biol.*, 61, 471-480.

Hendrix, R.W. 1999. The long evolutionary reach of viruses. *Curr. Biol.*, 9:914-917.

Hewson, I., J. M. O'Neil, J. A. Fuhrman, and W. C. Dennison. 2001. Virus-like particle distribution and abundance in sediments and overlying waters along eutrophication gradients in two subtropical estuaries. *Limnol. Oceanogr.* 46:1734-1746.

Holzapfel W.H. Haberer P., Snel J., Schillinger U., Veld Huis. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 85-101.

Holt J., Krieg N., Sneath J. And Stanley W. 1994. Group 17. Gram positive cocci. P. 527-559. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9° Ed.

Jiang, S. C., and J. H. Paul. 1998. Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2780-2787.

Klaenhammer T.R. and G.F. Fitzgerald. 1994. Bacteriophages and Bacteriophage resistance. *Appl. Genetics of Lactic Acid Bacteria*. Gasson and W de Vos. (eds.) Blackie and son, Ltd. U.K. p.106-168.

Knijff E., Dellaglio F., Lombardi A., Andrighetto C., Torriani S. 2001. *J. Microbiol. Methods* 47: 35-40.

Kozak W., Rajchert-Trzpił M., Zajdel J., Dobrzanski W. 1973. Lysogeny in lactic streptococci producing and not producing nisin. *Appl. Microbiology* 25: 305-308.

Kullen MJ., Sanozky-Dawes R.B., Crowell D.C., Klaenhammer T.R. 2000. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J. Appl. Microbiol.* 89:511-6.

Lahbib-Mansais Y., Mata M., Ritzenthaler P. 1988. Molecular taxonomy of Lactobacillus phages. *Biochimie* 70:429-435.

Lautier M., Novel G. 1987. DNA-DNA hybridizations among lactic streptococcal temperate and virulent phages belonging to distinct lytic groups. *J. Industr. Microbiol.* 2: 151-158.

Lawrence, J.G., Hatfull, G.F., Hendrix, R.W., 2002. Imbroglions of viral taxonomy genetic exchange and failings of phenetic approaches. *J. Bacteriol.*, 184, 4891-4905.

Lembke J.,Krusch U., Lompe A., Teuber M. 1980.Isolation and ultrastructure of bacteriophages of group N (lactic) streptococci. *Zbl. Bakt. Hyg.* 79-91.

López-Díaz T., Alonso C., Román C., García-López M., Moreno B. 2000. *Food Microbiol.* 17:23-32.

Lowrie R. 1974. Lysogenic strains of group N lactic streptococci. *Applied Microbiology* 27: 210-217.

Macedo A., Malcata F., Hogg T. 1995. Microbiological profile in Serra ewe's cheese during ripening. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 1-11.

McKay L., Baldwin K. 1973. Induction of prophage in *Streptococcus lactis* C2 by ultraviolet irradiation. *Applied Microbiology* 25: 682-684.

Mata M., Ritzenthaler P. 1988. Present state of lactic acid bacteria phage taxonomy. *Biochimie* 70: 395-399.

Monstein H., Quednau M., Samuelsson A., Ahme S., Isakson B., Jonasson J. 1998. Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods. *Microbiology* 144: 1171-1179.

Neve H., Teuber M. 1991. Basic Microbiology, and molecular biology of bacteriophage of lactic acid bacteria in dairies. In *Bulletin of practical phage control. International Dairy Federation N° 263.*

Neve H., Zenz K., Desiere F., Koch A., Heller K., Brussow H. 1998. Comparison of the lysogeny modules from the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophages TP-J34 and Sfi21: Implications for the Modular Theory of phage evolution. *Virology* 241: 61-72.

Neviani E., Mucchetti G., Contarini G. Carini S. 1982. Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani. *Il Latte* 7: 722-728.

Madigan M., Martinko J., Parker J. Brock .Biología de los microorganismos. Octava Edición revisada. 1999. PRENTICE HALL. IBERIA, Madrid.

McKay LL, Baldwin KA. 1990. Applications for biotechnology present and future improvements in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 87: 3-14.

Monstein H. Quednau M., Samuelsson A., Ahrne S., Isaksson B., Jonasson J. 1998. Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods. Microbiology 144: 1171-1179.

Murray B. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev. 3:46-65.

Norris J. And Ribbons D. 1970. Methods in Microbiology. 2° Ed. Cap 1:Classical and rapid identification methods for medically important bacteria.

Padulla ML, Ford ME, Houtz JM, Karthikeyan T, Wadsworth C, Jacobs-Sera D, Falbo J, Gross J, Pannunzio NR, Brucker W, Kumar V, Kandasamy J, Keenan L, Bardarov S, Kriakov J, Lawrence JG; Jacobs WR Jr, Hendrix RW, Hatfull GF.2002. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. Cell.113(2): 171-82.

Park C., McKay L. 1975. Induction of prophage in lactic streptococci isolated from commercial dairy starter cultures. J. Milk Food Technol. 38: 594-597.

Patel R., Piper M., Rouse J., Steckelberg J., Kohner P., Hopkins K., Cockerill F., Kline G. 1998. Determination of 16S rRNA sequences of enterococci and application to species identification of nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates. J. Clin. Microbiol. 36: 3399-3407.

Paul, J. H. 1999. Microbial gene transfer: an ecological perspective. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1:45-50

Raibaud P, Caulet M, Galpin J Mocquot G. 1961. studies of the bacterial flora of the alimentary tract of pigs II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. Appl. Bacteriol. 24.285-291.

Raya R.R., Kleemann E.G., Luchansky J.B., Klaenhammer T.R. 1989. Characterization of the temperate bacteriophage ϕ adh and plasmid transduction in *Lactobacillus acidophilus* ADH. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2206-2213.

Reinheimer J.A. 1994. Las bacterias lácticas. Ciencia y Tecnología de los Productos Lácteos. Ed. CERIDE. Santa Fe. Argentina.

- Reinheimer J., Suarez V., Bailo N., Zalazar C. 1995. Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for argentinian hard-cheese production. *J. Food Prot.* 58: 796-799.
- Reuter G. 1970. Lactobazillen und eng verwandte mikroorganismen in fleisch und fleischerzeugnissen, 2. Mitteilung: Die charakterisierung der isolierten lactobazillenstamme. *Fleischwitsch.* 954-962.
- Reyrolle J., Chopin M.C., Letellier F, Novel G. 1982. Lysogenic strains of lactic acid streptococci and lytic spectra of their temperate bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 349-356.
- Rohwer F and Edwards R. 2002. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. *J. Bacteriol.* 16: 4529-35.
- Sambrook y col, 1989, Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Savoy de Giori G. 1983. Comportamiento de fermentos regionales aplicados a la industria lechera. Tesis doctoral.
- Sechaud I, Cluzel P. J. Rousseau M, Baumgartner A, Accolas J. 1988. Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie* 70:401-410.
- Sechaud L., Callegari M, Rousseau M., Muller M. Accolas J. 1989. Relationship between temperate bacteriophage 0241 and virulent bacteriophage 832-B1 of *Lactobacillus helveticus*. *Neth. Milk Dairy J.* 43:261-277.
- Shimitzu-Kadota M., Sakurai T. Tsuchida N. 1983. Prophage origin of a virulent phage appearing on fermentations of *Lactobacillus casei* S-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 669-674.
- Sozzi T. 1994. Los bacteriófagos en la Industria lactocasearia. *Revista Argentina de Lactología.* 9:32-45.
- Spasova N., Paparkova K., Marcheva D. The ultrastructure of enterococcus bacteriophages 182 and 182a.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris J. 2001. *Antim. Agents and Chemotherapy.* 45:649-659.

87202

Susskind, M. and Botstein, D., 1978. Molecular genetics of bacteriophage P22, *Microbiol. Rev.*, 42, 385-413.

Terzaghi B, Sandine W. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* 29:807-814.

Terzaghi B, Sandine W. 1981. Bacteriophage production following exposure of lactic streptococci to ultraviolet radiation. *J. Gen. Microbiol.* 122:305-311.

Teuber M., Lembke J. 1983. The bacteriophages of lactic acid bacteria with emphasis on genetic aspects of group N lactic acid streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 283-295.

Valles E., Moquot E. 1972. Etude sur la technique de pré de la présure utilisée dans les fabrications traditionnelles des fromages de Gruyère de Comté et d'Emmental. *Lait* 52: 259-282.

Venema G, Kok J, van Sinderen D. 1999. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:3-23.

Whitehead H.R. and G.A. Cox.1936. Bacteriophage phenomena in cultures of lactic streptococci. *J. Dairy Res.* 7:55.

Whitehead H.R. 1953. Bacteriophage in cheese manufacture. *Bacteriological Reviews.* 17: 109-123.

U.N.R.C.
Biblioteca Central



60653

60653

