

## ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA FAGORRESISTENCIA DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL)

Reinheimer, J.A.<sup>1</sup>

### RESUMEN

Las infecciones fágicas de bacterias lácticas usadas como cultivos iniciadores en la industria láctea fermentativa, son una de las causas principales de fallas en su capacidad acidificante. Una prioridad de la investigación en esta área durante los últimos 25 años ha sido el desarrollo de cultivos fagorresistentes con buenas propiedades tecnológicas para procesos industriales. Diferentes estrategias han sido empleadas para el mejoramiento de cepas: 1) *Técnicas basadas en ADN recombinante* (Per, ARN antisentido y Sistema suicida), que han sido desarrolladas principalmente para lactococos, resultando altamente efectivas pero muy específicas hacia los fagos. Por otro lado, estas cepas "ingenierizadas" no pueden todavía aplicarse en alimentos. 2) *Transferencia conjugativa de plásmidos de fagorresistencia*, muy empleada para obtener cepas industriales en varios países, y 3) *Aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes* (a partir de cultivos secundarios o por citometría de flujo), que constituye una estrategia "natural" y, como en el caso anterior, permite obtener cepas "food grade". Son métodos simples y rápidos, salvo el de citometría, que requiere equipamiento específico y costoso.

**PALABRAS CLAVE:** bacterias lácticas, fagos, ADN recombinante, plásmidos, mutantes.

### SUMMARY

## STRATEGIES TO IMPROVE THE PHAGE RESISTANCE OF LACTIC ACID BACTERIA (LAB)

Phage infections of lactic acid bacteria used in the fermentative dairy industry are the principal cause of failures in their acidifying activity. In the last 25 years, a priority of research in this area was the development of phage resistant cultures with good technological capacity for industrial uses. Different strategies have been used to improve LAB strains: 1) *Recombinant DNA techniques* (Per, Antisense RNA and Suicide system). These were developed mainly for lactococci and turned out highly efficient but very specific against phages. Anyway, these genetically modified strains cannot be used for foods. 2) *Transfer of phage resistance determinants by conjugation*. This method has been very used in many countries to obtain industrial strains, and 3) *Isolation of spontaneous phage resistant mutants* (from secondary cultures or flow cytometry). This is a "natural" strategy and, so, allows to obtain "food grade" strains. Furthermore, it is a simple and rapid method, excepting for the cytometric alternative that requires a specific and expensive equipment.

**KEY WORDS:** lactic acid bacteria, phages, recombinant DNA, plasmids, mutants.

## INTRODUCCIÓN

La infección fágica de bacterias lácticas (BAL) usadas como cultivos iniciadores en la industria láctea fermentativa, es una de las causas principales de fallas en su capacidad acidificante (Neve, 1996; Moineau, 1999). Este hecho determina una menor velocidad o, en casos extremos, la detención del proceso fermentativo, lo que

deriva en severas consecuencias tecnológicas y comerciales (Limosowtin *et al.*, 1996).

La leche cruda es considerada la principal fuente de ingreso de fagos a las plantas procesadoras, debido a que los mismos son liberados a partir de las cepas lisógenas presentes (Everson, 1991; Dinsmore, 1995). Los fermentos naturales o artesanales (suero fermentos y leche fermentos) contienen, asimismo, una alta concentración fágica.

<sup>1</sup>Instituto de Lactología Industrial (INLAIN)- Facultad de Ingeniería Química (Universidad Nacional del Litoral), Santiago del Estero 2829-3000 Santa Fe- Argentina.

Estos fagos, liberados también por inducción espontánea, normalmente no alteran la actividad acidificante de estos fermentos ya que, en su compleja microflora láctica, ocurre una continua selección de cepas resistentes a los mismos (Giraffa, 1993; Neviani & Carini, 1994). El ingreso de fagos a las plantas constituye un problema difícil de manejar, ya que la diseminación de estas partículas virales en el ambiente industrial es muy rápida (Neve *et al.*, 1989).

El perfeccionamiento de los métodos para disminuir el nivel de bacteriofagos en plantas elaboradoras de yogur y quesos se ha tornado imprescindible, a fin de minimizar los riesgos de pérdidas económicas. En Argentina, el estudio de estrategias para controlar su presencia se ha abordado en los últimos años, a partir del reemplazo de los fermentos naturales, resistentes a fagos, por fermentos seleccionados importados con alta sensibilidad hacia los fagos autóctonos, principalmente para quesos blandos y semiblandos (Suárez *et al.*, 2002).

Consecuentemente, el éxito de fermentaciones lácticas comerciales depende, primeramente, de una adecuada selección de cepas no relacionadas en su fagoresistencia y, en segunda instancia, de la elección de adecuados métodos para controlar el ataque fágico. En este sentido, las estrategias tradicionales utilizadas incluyen rotación de los cultivos, medios de cultivo inhibitorios de fagos y condiciones asépticas de procesamiento (Forde and Fitzgerald, 1999; Sturino & Klaenhammer, 2004).

Una prioridad de la investigación sobre fagos de los últimos 25 años ha sido el desarrollo de cultivos fago resistentes con satisfactorias propiedades tecnológicas para usar en procesos industriales (Mc Grath *et al.*, 2002).

## MEJORAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS. ESTRATEGIAS

### 1) Técnicas basadas en ADN recombinante

El desarrollo de herramientas genéticas para este tipo de técnicas implica disponer de conocimientos derivados de los genomas fágicos. En este sentido, puesto que las bacterias lácticas del género *Lactococcus* y sus fagos específicos son los más estudiados entre todas las BAL, las técnicas de ADN recombinante se han diseñado sobre todo para este género. Las principales son las siguientes:

1.a) *Per (Phage encoded resistance)*: en este caso, se introduce en la célula hospedadora un fragmento de ADN que contiene el origen de replicación (*ori*) de un fago de lactococo. La cepa, inicialmente sensible al fago del cual proviene el *ori*, se vuelve resistente ya que el fragmento clonado compite con una normal replicación fágica, dando señales falsas para la misma y produciendo una prolifera-

ción retardada y disminuída del fago (Hill *et al.*, 1990). Esta técnica se ha mostrado altamente efectiva pero muy específica para distintos tipos de fagos (Kim & Batt, 1991)

1.b) *Estrategia “ARN antisentido”*: en este método, un cierto gen del genoma fágico fue clonado en orientación inversa con respecto a un fuerte promotor de lactococo. Esta construcción se introdujo en una cepa sensible a ese fago, volviéndose resistente. Se cree que se forma un duplex entre las hebras del ARN antisentido y las hebras activas (ARNm). Esta molécula híbrida es inestable y se degrada rápidamente. De este modo, se elimina el ARNm antes de que se traduzca en las proteínas estructurales de la partícula fágica.

1.c) *Sistema “suicida”*: consiste en una forma de infección abortiva diseñada mediante ingeniería genética. Es altamente efectivo como mecanismo y ha sido descrito sólo para lactococos. Es una “trampa genética” ya que un promotor fago-inducible (aislado del fago 031), luego de producida la infección, activa un sistema suicida bacteriano, formado por el cassette de restricción LlaIR<sup>+</sup>, letal frente a un amplio espectro de bacterias Gram +. Durante la infección fágica, tiene lugar la activación del promotor fágico inducible, que “dispara” la expresión del gen letal bacteriano, acarreado simultáneamente la muerte celular y la destrucción del genoma fágico (Djordjevic *et al.*, 1997).

### 2) Transferencia conjugativa de plásmidos de fagoresistencia

Muchos plásmidos con genes de resistencia fágica, en *Lactococcus*, son conjugativos y a menudo codifican otros markers de selección, tales como fermentación de la lactosa y resistencia a la nisina, que pueden ser usados para monitorear transconjugantes. La conjugación es un mecanismo natural de transferencia de genes, que puede ser usado en la industria para construir cepas resistentes a fagos. Por otra parte, estas estrategias pueden utilizarse para combinar mecanismos complementarios de defensa fágica en una única cepa. Casi todos los plásmidos de este tipo estudiados y utilizados en la práctica, llevan genes que codifican mecanismos de resistencia intracelular (R/M y Abi), aunque existen varios que codifican para bloquear adsorción fágica (Klaenhammer & Fitzgerald, 1994). Estas metodologías han sido ampliamente utilizadas para desarrollar cepas industriales en varios países. Muy interesante resulta la estrategia de rotación diseñada por Klaenhammer & Sing (1991) que emplea diferentes derivados (cepas) fago resistentes de una cepa madre especializada (Cuadro 1), los cuales poseen, cada uno, un plásmido diferente con distintos mecanismos de resistencia. Esta “phage defense rotation strategy” puede extender el plazo

**Cuadro 1.** Plásmidos conjugativos de fagorresistencia en *Lactococcus* utilizados para cepas industriales.

| Plásmido de resistencia | Mecanismos | Usos                | Referencia               |
|-------------------------|------------|---------------------|--------------------------|
| pTR2030                 | Abi + R/M  | quesería, USA       | Klaenhammer et al., 1990 |
| pCI528 + pCI750         | Ads + Abi  | Israel              | Dalet et al., 1991       |
| p1K2030                 | Abi + R/M  | quesería, USA       | Sing y Klaenhammer, 1993 |
| pTRK11                  | Abi + R/M  |                     |                          |
| pTRK68                  | R/M        |                     |                          |
|                         | R/M        |                     |                          |
| pMU1311                 | Abi + R/M  | quesería, Australia | Powell et al., 1994      |
| pSRQ700                 | R/M        |                     | Moineau et al., 1999     |
| pSRQ800 y pSRQ900       | Abi        |                     | Moineau et al., 1999     |

de uso sin inconvenientes de cepas particulares de BAL (Klaenhammer, 1991).

El cuadro 1 resume algunos de los plásmidos conjugativos con genes de resistencia fágica, utilizados hasta el presente, en aplicaciones industriales.

Sin embargo, la transferencia conjugativa de estos plásmidos ha presentado, también, algunos inconvenientes, tales como:

- cepas refractarias a la adquisición de ADN foráneo.
- ciertos markers de selección no son "food grade", lo que limita la aplicación industrial.
- incompatibilidad de plásmidos.
- inestabilidad de los plásmidos de fagorresistencia
- escasez de información acerca del efecto de múltiples plásmidos en el desarrollo celular y la producción de acidez.

Por otra parte, plásmidos no conjugativos y portadores de genes de resistencia fágica han sido también transferidos por transformación, originalmente por transformación de protoplastos pero luego, más convenientemente, por electroporación. También, genes de resistencia han sido clonados en adecuados vectores y luego, usados para transformación (Joseph y Neven 1998).

### 3) Aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes

Esta estrategia, que no apela a herramientas genéticas, ha sido revalorizada últimamente ya que presenta una serie de apreciables ventajas, que pueden resumirse en:

- es una estrategia simple y rápida
- no posee restricciones reglamentarias para su uso industrial ya que las variantes que se obtienen son derivados espontáneos de las cepas fago sensibles y, por lo tanto, poseen "food grade".
- es una metodología valiosa para géneros de BAL en los cuales los demás métodos son difíciles de aplicar (Por ej., en BAL termófilas, donde existe relativa ausencia de plásmidos y dificultad para conjugar o transformar plásmidos).

El método, sin embargo, ha sido raramente usado para cepas de lactococos debido a serios inconvenientes tales como disminución de la velocidad de crecimiento en leche y acidificación, estrecha especificidad fágica y/o reversión del fenotipo (fago resistencia) en los mutantes (Moineau, 1999; Sturino & Klaenhammer, 2004). Sin embargo, fue posible obtener este tipo de mutantes espontá-

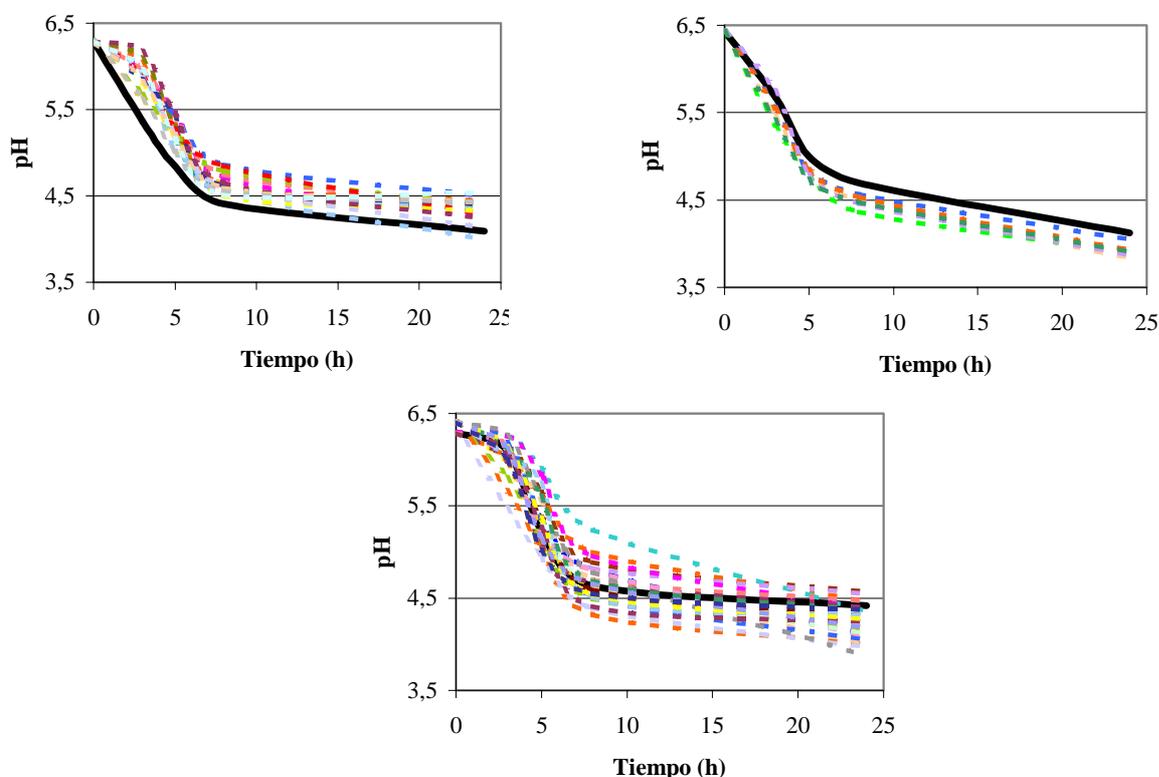
neos que conservan las propiedades tecnológicas de la cepa original, de BAL termófilas de fuerte importancia industrial: *Lactobacillus helveticus* (Neviani *et al.*, 1992, Reinheimer *et al.* 1993, Quiberoni *et al.* 1998), *Lactobacillus delbrueckii* (subsp. *lactis* y subsp. *bulgaricus*) (Guglielmotti *et al.*, 2005) y *S. thermophilus* (Binetti *et al.*, 2003). El método adquiere particular importancia en Argentina, donde la mayoría de los fermentos lácticos para quesería y leches fermentadas, son termófilos y donde las infecciones fágicas han representado en los últimos años un problema industrial de gran magnitud (Suárez *et al.*, 2002).

Para el caso particular de *L. helveticus*, ha sido posible aislar y caracterizar mutantes de este tipo con excelentes capacidades tecnológicas que han sido aplicados con éxito a procesos queseros (Quiberoni *et al.*, 1999).

*S. thermophilus* es la bacteria láctica de mayor importancia tecnológica en Argentina, dado su utilización para elaborar todas las leches fermentadas del país y una enorme variedad de quesos blandos y semiduros. Sin embargo, las cepas utilizadas actualmente (integrantes de fermentos importados, en su gran mayoría) se han mostrado

muy sensibles a los fagos autóctonos, hecho que acarrea una serie de problemas en la industria láctea fermentativa. Con el objetivo de proveer a la industria de cepas más resistentes a fagos, en nuestro laboratorio, ha sido posible aislar de varias cepas comerciales de *S. thermophilus*, mutantes espontáneos con una resistencia fágica muy alta y estable, y con buenas propiedades tecnológicas (Binetti *et al.*, 2003). Resulta interesante señalar que, dependiendo de la cepa fago sensible considerada, los mutantes obtenidos mostraron una actividad acidificante algo más alta, baja o igual a la cepa original (Fig. 1).

Por último, recientemente, ha sido publicado un nuevo método que ha sido aplicado a *S. thermophilus*, para separar de la población celular los mutantes fagoresistentes (por deficiencias de adsorción) utilizando en forma combinada citometría de flujo, inmunología y fluorocromos (Viscardi *et al.*, 2003, Viscardi *et al.*, 2003a). Esta técnica innovadora permite obtener variantes resistentes con propiedades tecnológicas adecuadas y aparece como una interesante estrategia “natural” para mejorar cepas, si bien requiere un equipamiento costoso.



**Figura 1.** Mutantes espontáneos fagoresistentes de *Streptococcus thermophilus*. Cinéticas de acidificación.

Resumiendo, puede decirse que el mejoramiento de la fagorresistencia en bacterias lácticas de importancia tecnológica es una prioridad esencial de la industria láctea y que diversas metodologías, más o menos complejas, han sido puestas a punto para responder a esa demanda, actualmente o a más largo plazo, cuando se modifiquen las reglamentaciones que limitan todavía el uso de “cepas ingenierizadas”.

## BIBLIOGRAFÍA

- BINETTI, A.; SUAREZ, V.; QUIBERONI, A. & REINHEIMER, J.A. 2003. Mutantes espontáneos de *Streptococcus thermophilus* resistentes a fagos autóctonos para procesos industriales. *Rev. Arg. Lactol.* 22: 77-96.
- DJORDJEVIC, G.M.; O'SULLIVAN, D.J.; WALKER, S.A.; CONKLING, M.A. & KLAENHAMMER, T.R. 1997. A triggered-suicide system designed as a defense against bacteriophages. *J. Bacteriol.* 179(21): 6741-6748.
- FORDE, A. & FITZGERALD, G. 1999. Bacteriophage defense systems in lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek* 76: 89-113.
- GUGLIELMOTTI, D.; REINHEIMER, J.A., GIRAFFA, G. & QUIBERONI, A. 2005. Spontaneous phage-resistant derivatives of *Lactobacillus delbrueckii* strains. Their characterization by genetic and technological parameters (unpublished).
- HILL, C.; MILLER, L.A. & KLAENHAMMER, T.R. 1990. Cloning, expression and sequence determination of a bacteriophage fragment encoding bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 172: 6419-6426.
- JOSEPHEN, J. & NEVE, H. 1998. Bacteriophages and lactic acid bacteria. En: Salminen, S. and von Wright, Atte von (ed.), *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects.* 2<sup>nd</sup> ed., pp 385-436. Marcel Dekker Inc., New York (USA).
- KIM, S.G. & BATT, C.A. 1991. Antisense mRNA-mediated bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environm. Microbiol.* 57: 1109-1113.
- KLAENHAMMER, T.R. 1991. Development of bacteriophage-resistant strains of lactic acid bacteria. *Biochem. Soc. T.* 19: 675-681.
- KLAENHAMMER, T.R. & FITZGERALD, G.F. 1994. Bacteriophages and bacteriophage resistance. En: Gasson, M.J. and de Vos, W. (ed.), *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*, pp. 106-168. Blackie Academic & Professional, Glasgow (UK).
- KLAENHAMMER, T.R. & SING, W.D. 1991. A novel rotation strategy using different phage defenses in a single-strain starter cultures system. *J. Dairy Sci.* 74: 120 (Abstract).
- Mc GRATH, S., van SINDEREN, D. & FITZGERALD, G. 2002. Bacteriophage-derived genetic tools for use in lactic acid bacteria. *Review. Int. Dairy J.* 12: 3-15.
- MOINEAU, S. 1999. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek* 76: 377-382.
- NEVIANI, E., CARMINATI, D. & GIRAFFA, G. 1992. Selection of some bacteriophages and lysozyme resistant variants of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892. *J. Dairy Sci.* 75: 905-913.
- QUIBERONI, A., REINHEIMER, J.A. & SUAREZ, V.B. 1999. Performance of *Lactobacillus helveticus* spontaneous phage resistant mutants in hard cheese production. *Int. Dairy J.* 8: 941-949.
- QUIBERONI, A., REINHEIMER, J.A. & TAILLIEZ, P. 1998. Characterization of *Lactobacillus helveticus* spontaneous phage resistant mutants by RAPD-PCR fingerprints and phenotypic parameters. *Food Res. Int.* 31: 537-542.
- REINHEIMER, J.A., MORELLI, L., CALLEGARI, M.L. and BOTTAZZI, V. 1993. Phage resistance in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 328. *Microb. Alim. Nutr.* 11: 235-240.
- STURINO, J. & KLAENHAMMER, T.R. 2004. Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria. *Ad. Appl. Microbiol.* 56: 331-378.
- SUAREZ, V.B., QUIBERONI, A., BINETTI, A. & REINHEIMER, J.A. 2002. Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinean dairy industries. *J. Food Prot.* 65(10): 1597-1604.
- VISCARDI, M., CAPPARELLI, R., DI MATTEO, R., CARMINATI, D. GIRAFFA, G. & IANELLI, D. 2003. Selection of bacteriophage-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus*. *J. Microbiol. Meth.* 55: 109-119.
- VISCARDI, M., CAPPARELLI, R. & IANELLI, D. 2003a. Rapid selection of phage-resistant mutants in *Streptococcus thermophilus* by immunoselection and cell sorting. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 223-231.