

Revista Argentina de Lactología - N°26 - 2009/10

LACTOBACILLUS CASEI/PARACASEI: AISLAMIENTO DE MUTANTES ESPONTÁNEOS FAGORRESISTENTES PARA USO INDUSTRIAL

Capra M.L.*, Mercanti D.J., Reinheimer J.A. y Quiberoni A.

Instituto de Lactología Industrial
UNL /CONICET - Facultad de Ingeniería Química
Santiago del Estero 2829, S3000AOM Santa Fe, Argentina
Tel: 0342 4530302 - *e-mail: mcapra@fbc.unl.edu.ar

Palabras clave

[fagorresistencia
[*Lactobacillus casei / paracasei*
[mutantes espontáneos

RESUMEN

Los fagos de bacterias probióticas son causa de enormes pérdidas económicas y severas limitaciones a las estrategias de control. En este trabajo se aislaron y caracterizaron mutantes de *L. casei/paracasei* empleando el primer fago *L. paracasei* aislado en Sudamérica en una planta industrial argentina. Se caracterizaron fenotipo (eficiencias de recuperación de resistentes verdaderos, estabilidad, resistencia frente a otros fagos específicos) y mecanismos de fagorresistencia (nivel de fagorresistencia, liberación espontánea de fagos virulentos, adsorción con y sin calcio). Se demostró que el aislamiento de mutantes espontáneos resistentes desde bacterias probióticas sensibles, resulta una alternativa válida para obtener cepas para rotar en procesos industriales.

**LACTOBACILLUS CASEI/PARACASEI:
ISOLATION OF BACTERIOPHAGE
INSENSITIVE MUTANTS
FOR THE DAIRY INDUSTRY**

Capra M.L.*, Mercanti D.J., Reinheimer J.A. y Quiberoni A.

Instituto de Lactología Industrial
UNL /CONICET - Facultad de Ingeniería Química
Santiago del Estero 2829, S3000AOM Santa Fe, Argentina
Tel: 0342 4530302 - *e-mail: mcapra@fbc.unl.edu.ar

Key words

[phage resistance

[*Lactobacillus casei* / *paracasei*

[bacteriophage insensitive mutants

SUMMARY

Phage attacks to probiotic strains cause enormous economic losses and limit common control strategies. In this work, spontaneous bacteriophage insensitive mutants were isolated from sensitive *L. casei/paracasei* strains against the first Sudamerican *L. paracasei* phage isolated in an Argentinean dairy plant. Phage resistance phenotype (efficiency of phage-resistant recovery, stability, sensitivity against other specific phages) and phage resistance mechanisms (phage resistance level, spontaneous release of virulent phages, phage adsorption with or without calcium ions) were characterized. The isolation of spontaneous phage-resistant mutants, from sensitive probiotic bacteria, was demonstrated to be a useful tool to obtain strains to rotate in industrial processes.

INTRODUCCIÓN

Muchas especies pertenecientes al género *Lactobacillus*, entre ellas *L. casei* y *L. paracasei*, han sido asociadas con efectos probióticos en humanos⁽¹⁾. Si bien suelen emplearse como aditivos, sin propagación durante la manufactura del producto probiótico, en algunos casos llevan adelante la fermentación misma del alimento^(2, 3, 4), convirtiéndose así en un blanco muy vulnerable para las infecciones fágicas⁽³⁾. Debido a las singularidades de cada cepa probiótica y al costo relacionado con su empleo en productos lácteos, en estos casos los ataques fágicos impactan muy negativamente desde un punto de vista económico⁽⁵⁾. Las infecciones fágicas a cepas probióticas podrían representar una nueva situación ecológica (diferente a las que ocurren en elaboraciones de yogur y queso) para la industria láctea⁽⁶⁾. Este nuevo escenario parece diferir también, comparándolo con el de las bacterias lácticas acidificantes, en la disponibilidad de estrategias efectivas para el control fágico. Las estrategias de rotación de cepas son inapropiadas para las bacterias probióticas y muchos de los fagos de *L. paracasei* aislados exhiben una notable resistencia térmica⁽⁶⁾, cobrando mayor importancia los tratamientos con desinfectantes⁽⁵⁾. El aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de cepas sensibles sería una alternativa posible que implica la utilización de la misma cepa, aunque resistente, y no su reemplazo por otra cepa diferente. Sin embargo, será imprescindible corroborar que las propiedades probióticas de la cepa original permanezcan intactas en la variante mejorada.

En este trabajo se abordó el aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes empleando 9 cepas sensibles al primer fago de *L. paracasei* aislado en Sudamérica (MLC-A)⁽⁷⁾.

MATERIALES Y METODOS

Cepas, fagos y medios de cultivo

Se trabajó con 9 cepas de *L. casei* / *paracasei* (Tabla 1) sensibles al fago MLC-A, primer fago de *L. paracasei* aislado en Sudamérica en una planta industrial de nuestro país que elabora un producto fermentado probiótico. Se empleó caldo MRS (Biokar, Beauvais, France) para el desarrollo y reactivación (o.n. a 37°C) de las cepas, así como para la propagación de los fagos. Las partículas fágicas se enumeraron en agar MRS-Ca-Gly por el método de la doble capa agarizada y se incubaron en microaerofilia a 34°C⁽⁸⁾.

Aislamiento de mutantes espontáneos

fagorresistentes a partir de cepas sensibles

Se aplicó la metodología de cultivo secundario para las 9 cepas mencionadas de *L. casei* / *paracasei*. Cultivos o.n. de las cepas sensibles se inocularon al 2% en caldo MRS-Ca e infectaron con una suspensión fágica de alto título del fago MLC-A (m.o.i.=0,5). Durante la incubación a 37°C, se monitoreó la evolución de los cultivos infectados, comparándolos con un control de la cepa sin infectar. Se seleccionaron aquellos cultivos que lisaron completamente en el transcurso del día, y que evidenciaron desarrollo posterior (cultivo secundario), luego de 7–9 d adicionales a 37°C. De esos cultivos secundarios estriados (agar MRS, 48 h, 37°C) se aislaron clones potencialmente resistentes, que fueron posteriormente

purificados y separados de las partículas fágicas presentes mediante tres nuevos estridados sucesivos^(9, 10).

Análisis genotípico de los mutantes fagorresistentes

Mediante RAPD-PCR se determinó el grado de homología genética entre los mutantes fagorresistentes y sus cepas madre respectivas. Se utilizaron los oligonucleótidos M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3')⁽¹¹⁾, 1254 (5'-CCGCAGCCAA-3')⁽¹²⁾, P1 (5'-TGCTCTGCCC-3')⁽¹³⁾ y P2 (5'-CTGCTGGGAC-3')⁽¹³⁾, cada uno en una experiencia independiente. Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa (1% p/v en TBE 1X) y los coeficientes de similitud se calcularon a partir de los perfiles obtenidos usando UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Averages)⁽¹⁴⁾.

Caracterización del fenotipo de fagorresistencia para los mutantes obtenidos

• Confirmación de la fagorresistencia

Los mutantes espontáneos obtenidos, potencialmente fagorresistentes o mutantes presuntivos, se testearon en un ensayo de sensibilidad en caldo MRS-Ca (Test de turbidez)⁽⁸⁾, frente a sus fagos específicos. Se consideraron mutantes resistentes confirmados aquellos a clones que luego de tres repiques de sensibilidad sucesivos, no evidenciaron lisis.

• Estabilidad de la fagorresistencia

Cultivos de los clones verdaderamente resistentes, incubados durante 16-18 h a 37°C, se inocularon en caldo MRS-Ca, luego se infectaron con una suspensión de fagos (m.o.i.=5) y se incubaron a 37°C. En el transcurso del día, se siguió el desarrollo de los cultivos infectados comparándolos con un control del clon sin infectar. Los cultivos que permanecieron sin lisar se repicaron al día siguiente a caldo MRS-Ca fresco, en modo similar a un test de turbidez, pero adicionando en cada repique, una nueva dosis de suspensión de fago. De este modo, se buscó ejercer una presión fágica fuerte y continua sobre los clones que resultaron resistentes. Se consideró estable a la resistencia de aquellos clones que fueran capaces de superar 7 repiques de estabilidad. La lisis del cultivo en alguno de los repiques indicó la pérdida de la fagorresistencia, de acuerdo a lo sugerido por Carminati y col⁽¹⁰⁾.

• Eficiencia de recuperación de mutantes fagorresistentes

Se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ mutantes resistentes confirmados}}{\text{N}^{\circ} \text{ mutantes resistentes presuntivos}} \times 100 \quad (1)$$

• Espectro de resistencia fágica de los mutantes obtenidos

Se investigó si los mutantes resistentes y estables aislados frente al fago MLC-A, también se mostraban resistentes frente a otros fagos (Tabla 1) de *L. casei* / *paracasei*. Se emplearon 0,3 ml de cultivos o.n. de las clones resistentes y 0,1 ml de suspensiones de alto título de los fagos. Se consideraron resistentes a aquellos mutantes capaces de superar los tres repiques de la sensibilidad sin presentar lisis del cultivo.

TABLA 1:**Cepas y fagos empleados**

CEPAS Y FAGOS	Características relevantes	Referencia y/o Fuente
Cepas		
<i>L. casei</i> 393	Cepa sensible al fago A2	ATCC
<i>L. casei</i> 27139	Cepa sensible al fago J-1	ATCC
<i>L. paracasei</i> 27092	Cepa sensible al fago PL-1	ATCC
<i>L. paracasei</i> A	Cepa comercial. Sensible a los fagos MLC-A y MLC-A8	Colección INLAIN (7)
<i>L. paracasei</i> Yk	Cepa comercial	Colección INLAIN (7)
<i>L. paracasei</i> Hn	Cepa comercial	Colección INLAIN (7)
<i>L. paracasei</i> Dn	Cepa comercial	Colección INLAIN (7)
<i>L. paracasei</i> A13	Cepa comercial	Colección INLAIN (7)
<i>L. paracasei</i> A14	Cepa comercial	Colección INLAIN (7)
Fagos		
A2	Fago de <i>L. casei</i>	Colección INLAIN (15)
J-1	Fago de <i>L. casei</i>	ATCC (16)
PL-1	Fago de <i>L. paracasei</i>	ATCC (17)
MLC-A	Fago de <i>L. paracasei</i> aislado en Argentina de un producto fermentado probiótico	Colección INLAIN (7)
MLC-A8	Fago de <i>L. paracasei</i> aislado en Argentina a partir de un producto fermentado probiótico	Colección INLAIN (6)

- **Nivel de fagoresistencia (EOP)**

Una suspensión (10^9 UFP/ml) del fago MLC-A en MRS fue titulada⁽⁸⁾ tanto sobre la cepa madre sensible correspondiente como sobre los clones mutantes fagoresistentes. La relación entre el título fágico obtenido sobre el mutante y el logrado sobre la cepa madre sensible correspondiente se definió como EOP.

- **Liberación espontánea de fagos virulentos**

Cultivos o.n. de los clones resistentes se desarrollaron en caldo MRS a 30°C, se centrifugaron (5000 rpm, 10 min, 5°C) y posteriormente se filtraron por membranas (diámetro de poro, 0,45 μ m) Millipore (Sao Paulo, Brazil). Alícuotas (50 μ L) de los sobrenadantes se ensayaron sobre un césped de cada una de las 9 cepas sensibles (en agar MRS-Ca-Gly) y se incubaron (o.n.) en microaerofilia a 34°C (Spot test). La existencia de placas de lisis visibles se debe a la liberación espontánea de partículas fágicas⁽¹⁸⁾.

- **Tasas de adsorción**

Se determinó el nivel de adsorción del fago sobre cada mutante fagoresistente y sobre su cepa madre (control), tanto en presencia como en ausencia de calcio. Los cultivos bacterianos en fase exponencial temprana ($O.D._{560} = 0,5$) se centrifugaron (5000 rpm, 10 min) y las células cosechadas se resuspendieron en caldo MRS y MRS-Ca en la mitad del volumen original. Cada cultivo se in-

fectó con el fago MLC-A (m.o.i.=0,01 - 0,02) y se incubó a 37°C por 30 min. Luego, los tubos se centrifugaron (10000 rpm, 5 min, 5°C) y los sobrenadantes se titularon⁽⁸⁾ sobre *L. paracasei* A. Los porcentajes de adsorción (sobre la cepa madre y mutantes resistentes) se calcularon según:

$$\% \text{ Ads} = [(T_i - T_f) / T_i] \times 100 \quad (2)$$

siendo T_i el título inicial de fagos (UFP/ml) puestos en contacto con la cepa, y T_f los fagos remanentes en el sobrenadante luego de 30 min (fagos no adsorbidos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

• Aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de cepas sensibles

El aislamiento de mutantes presuntivos resistentes al fago MLC-A fue posible para 5 de las 9 cepas estudiadas (Tabla 2). El desarrollo secundario, posterior a la lisis de los cultivos infectados, se produjo entre los 2 y 9 d.

• Confirmación de la fagorresistencia y eficiencia de recuperación de mutantes fagorresistentes

El aislamiento de clones resistentes confirmados, capaces de resistir la infección fágica a lo largo de tres subcultivos sucesivos (Test de turbidez) fue posible sólo para *L. paracasei* ATCC 27092 y *L. casei* ATCC 27139 (Tabla 2). Los demás clones presuntivos aislados lisaron al primer subcultivo, considerándose resistentes falsos y se descartaron. Las eficiencias de recuperación calculadas según (1) para *L. paracasei* ATCC 27092 y *L. casei* ATCC 27139 fueron de 83 y 100%, respectivamente.

TABLA 2:

Mutantes espontáneos fagorresistentes obtenidos con el fago MLC-A a partir de cepas sensibles de *L. casei* / *paracasei* mediante la técnica de cultivo secundario

CEPA SENSIBLE (<i>L. casei</i> o <i>L. paracasei</i>)	DESARROLLO CULTIVO SECUNDARIO (d)	N° DE MUTANTES FAGORRESISTENTES		EFICIENCIA DE RECUPERACIÓN DE MUTANTES CONFIRMADOS (%)
		Presuntivos	Confirmados	
393	2	11	0	0
27139	9	5	5	100
27092	7	6	5	83
A	7	10	0	0
Yk	s.d.			
Hn	s.d.			
Dn	7	11	0	0
A13	s.d.			
A14	s.d.			

s.d.: sin desarrollo

• **Homología de ADN entre los mutantes fagorresistentes obtenidos y sus cepas madre respectivas**

Todos los mutantes obtenidos tuvieron una homología de ADN mayor al 99% con respecto a sus cepas madre respectivas, tanto para *L. paracasei* ATCC 27092 como para *L. casei* ATCC 27139, y para los 4 oligonucleótidos iniciadores empleados. Así, se comprueba que no hubo cambios genéticos notables en el proceso de adquisición de la fagorresistencia, y que no se produjeron contaminaciones durante la obtención de las variantes.

• **Estabilidad de la fagorresistencia**

El 80% de las variantes resistentes aisladas a partir de *L. casei* 27139 superó 7 repiques sucesivos en presencia del fago, mientras que las de ATCC 27092 mostraron fenotipos inestables (Tabla 3).

El mismo fenotipo estudiado en cepas de otras bacterias lácticas, mostró diversidad de comportamientos. Para mutantes aislados de *L. helveticus* con el fago hv⁽³⁰⁾, la estabilidad fue baja y sólo el 15,4% logró alcanzar el último repique. Los resistentes de distintas cepas de *Streptococcus thermophilus* presentaron una gran variación entre los grupos de mutantes aislados, con un rango entre 0 y 100% de clones que alcanzaron el último repique sin presentar lisis del cultivo⁽¹⁹⁾. Para el caso de *L. delbrueckii*, casi la totalidad de los clones fue estable hasta el séptimo repique para 2 cepas, mientras que para otra, sólo el 42% resistió la presión fágica hasta el final del ensayo sin lisar⁽²⁰⁾.

• **Espectro de resistencia fágica de los mutantes obtenidos**

Se evaluó la sensibilidad de los mutantes frente a otros fagos específicos de *L. casei* / *paracasei* (PL-1, J-1, A2 y MLC-A8), observándose resistencia a los mismos (excepto J-1) para todos los clones de ATCC 27139 y diferentes grados de sensibilidad para los clones de ATCC 27092 (Tabla 4). Si bien las variantes resistentes obtenidas con el fago MLC-A no resultaron totalmente efectivas frente a los demás fagos ensayados, se demostró un notable incremento en su capacidad de resistir las infecciones, especialmente para los clones de *L. casei* 27139.

TABLA 3:
Estabilidad de la fagorresistencia de los mutantes aislados a partir de *L. casei* 27139 y *L. paracasei* 27092 (% de mutantes que resistieron sucesivos repiques en presencia de fagos, sin perder el fenotipo)

MUTANTES AISLADOS (Cepa)	Nº DE REPIQUES						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>L. casei</i> 27139 nR = 5	100	100	100	80	80	80	80
<i>L. paracasei</i> 27092 nR = 5	100	100	100	80	40	0	

nR: número de mutantes espontáneos fagorresistentes confirmados, aislados a partir de las respectivas cepas sensibles.

TABLA 4:

Espectro de resistencia fágica de los mutantes aislados a partir de *L. casei* 27139 y *L. paracasei* 27092, con los fagos MLC-A, PL-1, J-1, A2 y MLC-A8.

CEPAS clones resistentes a MLC-A derivados	FAGOS				
	MLC-A	PL-1	J-1	A2	MLC-A8
<i>L. casei</i> 27139	+ (1°)	+ (1°)	+ (1°)	+ (1°)	+ (1°)
ch1	-	-	+ (3°)	-	-
Rch2	-	-	+ (3°)	-	-
g1	-	-	-	-	-
g2	-	-	-	-	-
g3	-	-	+/- (3°)	-	-
<i>L. paracasei</i> 27092	+ (1°)	+ (1°)	+ (1°)	+ (1°)	+ (1°)
ch1	-	+ (2°)	+ (3°)	-	-
ch2	-	+ (2°)	+ (3°)	+ (3°)	+ (3°)
ch3	-	+ (2°)	+ (3°)	+ (3°)	+ (3°)
g2	-	+ (2°)	+ (3°)	+ (3°)	+ (3°)
g3	-	+ (2°)	+ (3°)	-	+ (2°)

+ : lisis, indicándose entre paréntesis el n° de repique en el cual se produjo.

+/- : disminución de turbidez respecto del control sin infectar.

- : ausencia de lisis.

Además, se vio que en general, los clones fueron más sensibles para el fago que lisa en forma específica a la cepa de origen (J-1 para *L. casei* 27139 y PL-1 para *L. paracasei* 27092). Un caso diferente se observó para *L. delbrueckii*⁽²⁰⁾, ya que todos los mutantes obtenidos de tres cepas, cada una con su fago específico, resultaron resistentes a lo largo de tres repiques de sensibilidad frente a los otros dos fagos empleados.

• Nivel de fagorresistencia (EOP)

El fago MLC-A fue incapaz de formar placas de lisis en medio agarizado sobre las variantes resistentes obtenidas. Los valores de EOP calculados fueron inferiores a 10⁻⁹ evidenciando según Moineau⁽²¹⁾, el máximo nivel de fagorresistencia técnicamente posible de cuantificar, en comparación con sus cepas madres.

• Liberación espontánea de fagos virulentos

La lisogenia se encuentra ampliamente difundida en cepas de *L. casei* / *paracasei*^(22, 15, 23, 24, 25), e incluso ambas cepas empleadas en este trabajo son sabidamente lisógenas^(26, 27). Sin embargo, no se detectó liberación espontánea de fagos virulentos (a 30°C) a partir de los clones ni de sus cepas madres, ensayando (Spot Test) los sobrenadantes de cultivo sobre las 9 cepas de *L. casei* / *paracasei* utilizadas en este trabajo. Estas cepas parecen ser especialmente susceptibles frente a fagos, ya que además de ser sensibles al fago MLC-A, son sensibles al menos a otros 10 fagos de *L. casei* / *paracasei*^(4, 5, 6).

- **Tasas de adsorción**

Los mutantes fagorresistentes surgen probablemente como consecuencia de mutaciones puntuales espontáneas en el cromosoma⁽²⁸⁾ y en la mayoría de los casos, la adquisición de resistencia se debe a cambios en el receptor para la adsorción del fago específico⁽²⁹⁾. Al estudiar la adsorción del fago MLC-A en presencia de iones calcio sobre los clones de ATCC 27092 se obtuvieron, según (2), valores elevados ($76 \pm 4\%$) aunque disminuidos en comparación con su cepa madre sensible (99%) (Fig. 1a). Sin embargo, la diferencia más notable se obtuvo al evaluar la adsorción en ausencia de calcio. Mientras que las variantes resistentes fueron incapaces de adsorber al fago en ausencia de calcio, *L. paracasei* ATCC 27092 lo adsorbe prácticamente con igual eficiencia con (99%) y sin calcio (98%). Tanto *L. casei* ATCC 27139 como sus mutantes adsorbieron al fago en presencia y ausencia de calcio, si bien para cada clon los valores obtenidos fueron significativamente diferentes. Nuevamente, la adsorción resultó más efectiva sobre la cepa original (prácticamente 94 y 74%, con y sin catión, respectivamente), que sobre las variantes de ella derivadas ($67 \pm 10\%$ con calcio y $35 \pm 7\%$ sin calcio) (Fig. 1b).

CONCLUSIONES

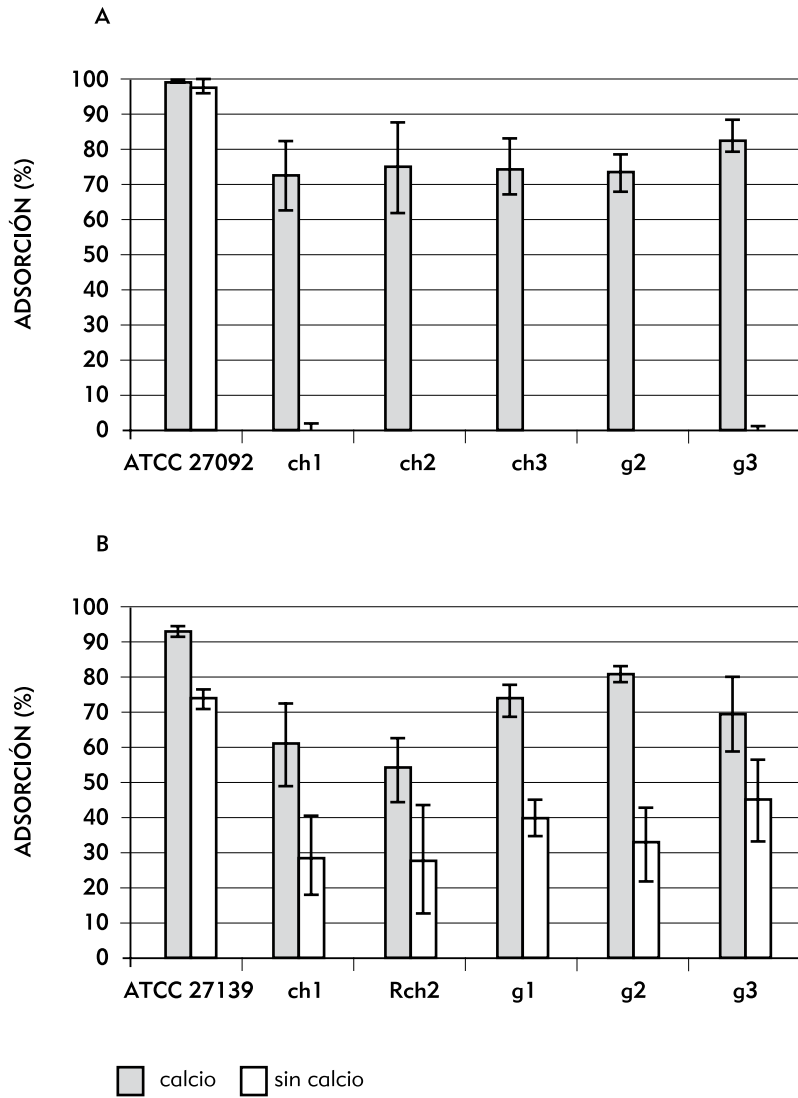
Esta metodología sería una estrategia útil para encontrar variantes resistentes a fagos con potencial uso en el proceso de producción, por reemplazo de la cepa original afectada. Sin embargo, es indispensable la realización de estudios posteriores para corroborar si los clones así obtenidos presentan atributos probióticos comparables a los de la cepa de la cual provienen.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con fondos asignados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET; Proyecto PIP 5321) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de Argentina (ANPCyT; Proyecto PICT 20358).

FIGURA 1:

Adsorción del fago MLC-A sobre *Lactobacillus paracasei* ATCC 27092 (A), *L. casei* ATCC 27139 (B) y sus variantes resistentes a fago, en presencia y ausencia de iones calcio.



NOMENCLATURA

- ATCC = American Type Culture Collection
EOP = Eficiencia de plaqueo (Efficiency of Plaquing)
INLAIN = Instituto de Lactología Industrial
m.o.i. = multiplicidad de la infección (multiplicity of infection), n° de partículas fágicas infectivas / n° de unidades formadoras de colonias
MRS = de Man, Rogosa y Sharp
MRS-Ca = MRS adicionado con CaCl₂ (10 mM)
MRS-Ca-Gly = MRS-Ca adicionado con glicina (100 mM)
O.D.560 = densidad óptica a una longitud de onda de 560 nm
o.n. = overnight
RAPD-PCR = Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction
TBE = solución reguladora Tris Borato EDTA
UFC = unidades formadoras de colonias
UFP = unidades formadoras de placas

BIBLIOGRAFÍA

- ⁽¹⁾ Parvez, S., K.A. Malik, S.A. Kang y H.Y. Kim (2006), Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 100, pp. 1171-85.
- ⁽²⁾ Forsman, P., J. Tanskanen, y T. Alatosava (1993), Structural similarity and genetic homology between *Lactobacillus casei* bacteriophages isolated in Japan and in Finland, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, Vol. 57, pp. 2043-2048.
- ⁽³⁾ Saarela, M., G. Mogensen, R. Fondén, J. Matto y T. Mattila-Sandholm (2000), Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *Journal of Biotechnology*, Vol. 84, pp. 197-251.
- ⁽⁴⁾ Capra, M.L., A.L. Quiberoni, H.W. Ackermann, S. Moineau y J.A. Reinheimer (2006b), Characterization of a new virulent phage (MLC-A) of *Lactobacillus paracasei*, *Journal of Dairy Science*, Vol. 89, pp. 2414-2423.
- ⁽⁵⁾ Capra, M.L. (2007), Bacteriofagos de *Lactobacillus casei* / *paracasei*. Caracterización y estudio de la fagorresistencia. Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas.
- ⁽⁶⁾ Capra, M.L., A.G. Binetti, D.J. Mercanti, A. Quiberoni y J.A. Reinheimer (2009), Diversity among *Lactobacillus paracasei* phages isolated from a probiotic dairy product plant, *Journal of Applied Microbiology*, (Vol 107, pp 1350-1357).
- ⁽⁷⁾ Capra, M.L., A. Quiberoni y J.A. Reinheimer (2006a), Phages of *Lactobacillus casei* / *paracasei*: Response to environmental factors and interaction with collection and commercial strains. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 100, pp. 334-342.
- ⁽⁸⁾ Svensson V. y A. Christiansson (1991), Methods for phage monitoring, *FIL-IDF Bulletin*, Vol. 263, pp. 29-39.
- ⁽⁹⁾ Callegari, M.L. (1992), Tesis para obtener el Título de Dottore de Ricerca della Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italia.

⁽¹⁰⁾ Carminati, D., R. Zennaro, E. Neviani y G. Giraffa (1993), Selección e características de mutantes fago-resistentes de *Lactobacillus helveticus*, *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, Vol. 44(1), pp. 33-48.

⁽¹¹⁾ Huey, B y J. Hall (1989), Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *Journal of Bacteriology*, Vol. 171, pp. 2528–2532.

⁽¹²⁾ Akopyanz, N., N.O. Bukanov, T.U. Westblom, S. Kresovich y D.E. Berg (1992), DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, Vol 20, pp. 5137–5142.

⁽¹³⁾ Quiberoni, A., J. Reinheimer y P. Tailliez (1998), Characterization of *Lactobacillus helveticus* phage resistant mutants by RAPD fingerprints and phenotypic parameters, *Food Research International*, Vol. 31(8), pp. 537-542.

⁽¹⁴⁾ Vauterin, L. y P. Vauterin (1992), Computer aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *European Microbiology*, Vol. 1, pp. 37-41.

⁽¹⁵⁾ Herrero, M., C.G. de los Reyes-Gavilán, J.L. Caso y J.E. Suárez (1994), Characterization of ϕ 393-A2, a bacteriophage that infects *Lactobacillus casei*. *Microbiology*, Vol. 140, pp. 2585 – 2590.

⁽¹⁶⁾ Hino, M. y N. Ikebe (1965), Studies on the lactic acid bacteria employed for beverage production. II. Isolation and some properties of a bacteriophage infected during the fermentation of lactic acid beverage. *Journal Agricultural Chemical Society of Japan*, Vol. 39, pp. 472-476.

⁽¹⁷⁾ Watanabe, K., S. Takesue, K. Jin-Nai y T. Yoshikawa (1970), Bacteriophage active against the lactic acid beverage-producing bacterium *Lactobacillus casei*, *Applied Microbiology*, Vol. 20, pp. 409 – 415.

⁽¹⁸⁾ Cluzel, P.J., M. Veaux, M. Rousseau, y J.-P. Accolas (1987), Evidence for temperate bacteriophages in two strains of *Lactobacillus bulgaricus*, *Journal of Dairy Research*, Vol. 54, pp. 397-405.

⁽¹⁹⁾ Binetti, A.G. (2001), Bacteriofagos autóctonos de *Streptococcus thermophilus*: aislamiento, caracterización y obtención de mutantes fago-resistentes. Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del grado académico de Doctor en Química.

⁽²⁰⁾ Guglielmotti, D.M. (2007), Caracterización molecular de fagos argentinos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y obtención de mutantes fagorresistentes para aplicaciones industriales. Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas.

⁽²¹⁾ Moineau, S. (1999), Application of phage resistance in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 76, pp. 377-382.

⁽²²⁾ Shimizu-Kadota, M. y T. Sakurai (1982), Prophage curing in *Lactobacillus casei* by isolation of a thermoinducible mutant, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 43(6), pp. 1284 – 1287.

⁽²³⁾ Nakashima, Y., H. Ikeda, Y. Kakita, F. Miake y K. Watanabe (1994), Restriction map of the genomic DNA of *Lactobacillus casei* bacteriophage PL-1 and nucleotide sequence of its cohesive singled-stranded ends, *Journal of General Virology*, Vol. 75, pp. 2537 – 2541.

⁽²⁴⁾ Lo, T.C., T.C. Shih, C.F. Lin, H.W. Chen y T.H. Lin (2005), Complete genomic sequence of the temperate bacteriophage Φ AT3 isolated from *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Virology*, Vol. 339, pp. 42 – 55.

⁽²⁵⁾ Ventura, M., C. Canchaya, V. Bernini, E. Altermann, R. Barrangou, S. Mcgrath, M.J. Claesson, Y. Li, S. Leahy, C.D. Walker, R. Zink, E. Neviani, J. Steele, J. Broadbent, T.R. Klaenhammer, G.F. Fitzgerald, P.W. O'Toole, y D. Van Sinderen (2006), Comparative genomics and transcriptional analysis of prophages identified in the genomes of *Lactobacillus gasserii*, *Lactobacillus salivarius*, and *Lactobacillus casei*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72(5), pp. 3130-3146.

⁽²⁶⁾ Shimizu-Kadota, M.; T. Sakurai y N. Tsuchida (1983), Prophage origin of a virulent phage appearing on fermentations of *Lactobacillus casei* S-1, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 45(2), pp. 669 – 674.

⁽²⁷⁾ Nakashima, Y.; Hasuwa, H.; Kakita, Y.; Murata, K.; Kuroiwa, A.; Miake, F. y Watanabe, K. (1998), A temperate phage with cohesive ends induced by mitomycin C treatment of *Lactobacillus casei*. *Arch. Virol.*, Vol. 143, pp. 1621 – 1626.

⁽²⁸⁾ Klaenhammer, T.R. y G.F. Fitzgerald (1994), Bacteriophages and bacteriophage resistance, *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria/ ed. Gasson y de Vos/*, Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK, pp. 106 - 168.

⁽²⁹⁾ Boucher, I. y S. Moineau (2001), Phages of *Lactococcus lactis*: an ecological and economical equilibrium, *Recent Research Development in Virology*, Vol. 3, pp. 243 - 256.

⁽³⁰⁾ Quiberoni, A., J.A. Reinheimer y V.B. Suárez (1998), Performance of *Lactobacillus helveticus* spontaneous phage-resistance mutants in a hard cheese production, *International Dairy Journal*, Vol. 8, pp. 941-949.