



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS  
POR MÉTODOS MICROBIOLÓGICO Y MOLECULAR EN  
MUESTRAS DE UNA EMPRESA LÁCTEA”**

**TESIS COLECTIVA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MARÍA FERNANDA NIEVES HERNÁNDEZ**

**STEPHANIE ALCARAZ AMADOR**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. BLANCA ESTELA GARCÍA ALMENDAREZ**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2019.**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE  
BACTERIÓFAGOS POR MÉTODOS  
MICROBIOLÓGICO Y MOLECULAR EN MUESTRAS DE  
UNA EMPRESA LÁCTEA”**

**TESIS COLECTIVA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

**MARÍA FERNANDA NIEVES HERNÁNDEZ**

**STEPHANIE ALCARAZ AMADOR**

DIRIGIDA POR

**Dra. BLANCA ESTELA GARCÍA ALMENDÁREZ**

SINODALES

**Dra. BLANCA ESTELA GARCÍA ALMENDÁREZ** \_\_\_\_\_

DIRECTOR

**Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ** \_\_\_\_\_

SINODAL

**Dra. SILVIA AMAYA LLANO** \_\_\_\_\_

SINODAL

**Dr. ALDO AMARO REYES** \_\_\_\_\_

SINODAL

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
1. ANTECEDENTES	1
1.1. La leche	1
1.2. Leches fermentadas: yogurt	2
1.3. Problemas durante la elaboración de yogurt	4
1.4. Definición de bacteriófago	5
1.5. Clasificación de bacteriófago y especie comunes para <i>S. thermophilus</i> y <i>Lactobacillus</i>	6
1.6. Mecanismo de infección	7
1.7. Interacción entre BAL y bacteriófagos	10
1.8. Fuentes de bacteriófagos en la industria láctea	11
1.9. Estrategias de control	11
1.10. Métodos de detección	12
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS	16
3.1. General	16
3.2. Específicos	16
4. METODOLOGÍA	17
4.1. Materiales	17
4.1.1. Material biológico	17
4.1.2. Material para método microbiológico	17
4.1.3. Material para método molecular	17
4.2. Métodos	18
4.2.1. Preparación de conservas	18
4.2.2. Elaboración de curva de crecimiento	19

4.2.3. Detección de bacteriófagos	19
4.2.4. Aislamiento de ADN vírico de bacteriófagos utilizando el paquete de ADN de bacteriófagos Norgen®	20
4.2.5. Aislamiento de ADN vírico de bacteriófagos por método molecular alternativo	21
4.2.6. Cuantificación de ADN vírico extraído del sobrenadante clarificado de bacteriófagos	22
4.2.7. Evaluación de la integridad del ADN vírico extraído	22
4.2.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
4.2.9. Optimización de condiciones de PCR: gradiente de temperatura	23
4.2.10. Optimización de condiciones de PCR: gradiente de cloruro de magnesio	24
4.2.11. Diseño experimental	25
5. RESULTADOS	27
5.1. Elaboración de curvas de crecimiento	27
5.2. Detección de bacteriófagos por método microbiológico	29
5.3. Cuantificación de ADN vírico extraído del sobrenadante clarificado de bacteriófagos	31
5.4. Evaluación de integridad de ADN vírico extraído	33
5.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35
5.6. Optimización de condiciones de PCR: gradiente de temperatura	35
5.7. Optimización de condiciones de PCR: gradiente de cloruro de magnesio	39
5.8. Determinación de límite de detección	41
6. DISCUSIÓN	42
7. CONCLUSIONES	62
8. BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Condiciones de cultivo e incubación para cultivos iniciadores	19
2	Lista de oligos usados en la PCR	24
3	Muestras recolectadas en la planta Sigma Alimentos	28
4	Resultados del método de doble capa para la detección de fago en muestras	30
5	Concentración de ADN, relación 260/280 y 260/230 para el ADN de las muestras positivas extraídas por el paquete y el método alternativo	32
6	Condiciones de temperatura de alineamiento empleados en la PCR	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales fagos presentes en productos lácteos.	7
2	Ciclos de reproducción de bacteriófagos.	9
3	Resumen de metodología.	26
4	Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> en medio MRS suplementado con CaCl <sub>2</sub> y MgCl <sub>2</sub> .	27
5	Curva de crecimiento de <i>S. thermophilus</i> en medio M17 suplementado con CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub> y lactosa.	27
6	Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> en medio MRS suplementado con CaCl <sub>2</sub> y MgCl <sub>2</sub> .	28
7	Zona de lisis sobre <i>Streptococcus</i> liofilizado usando batido 6.	29
8	Zonas de lisis sobre cepa <i>Lb. plantarum</i> usando el fago específico ATCC 8014 - B2.	29
9	Electroforesis de agarosa con ADN de las 12 muestras positivas y extraído con el paquete.	33
10	Electroforesis de agarosa con ADN de las 12 muestras positivas y extraído con el método alternativo.	34
11	Electroforesis de agarosa con ADN extraído por paquete y método alternativo.	34
12	Electroforesis de PCR con gradiente de temperatura (50 - 60 °C) con ADN de fago ATCC 8014 - B2.	37

13	Electroforesis de PCR, gradiente de temperatura (50 - 60 °C) con ADN de fago de <i>Lb. delbrueckii</i> y TAIR/TAIF.	38
14	Electroforesis de PCR, gradiente de temperatura (55 - 65 °C) con ADN de fago de <i>Lb. delbrueckii</i> y MHF/MHR.	38
15	Electroforesis de PCR con gradiente de MgCl <sub>2</sub> (4.0 – 8.0 mM) con ADN de fago ATCC 8014 - B2.	39
16	Electroforesis de PCR con gradiente de MgCl <sub>2</sub> (4.0 – 7.5 mM) con ADN de fago de <i>Lb. delbrueckii</i> y TAIR/TAIF.	40
17	Electroforesis de PCR con gradiente de MgCl <sub>2</sub> (4.0 – 7.5 mM) con ADN de fago de <i>Lb. delbrueckii</i> y MHF/MHR.	40
18	Electroforesis de determinación de límite de detección en PCR con ADN de fago de ATCC 8014 - B2.	41
19	Curva de desarrollo teórica.	42
20	Apariencia de las zonas de inhibición por fagos rV5 con el método del doble agar, el método directo en placa y el método de la gota.	48
21	Marcador de 1 Kb de Invitrogen.	57

## RESUMEN

La leche es un alimento ampliamente usado debido a su aporte nutricional y versatilidad para la elaboración de diversos productos. Los productos fermentados, como el yogurt, se basan en la adición de bacterias ácido lácticas (BAL) que acidifican el medio. Las BAL usualmente empleadas son *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Sin embargo, pueden sufrir el ataque de bacteriófagos, los cuales causan una lenta acidificación o incluso inhiben la actividad fermentadora de las BAL. Ensayos microbiológicos y moleculares se han desarrollado para la identificación de bacteriófagos.

En el presente trabajo, se emplearon ensayos microbiológicos (doble capa) y moleculares (PCR) para la identificación de fago en muestras lácteas, usando *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* como bacterias huésped. Se presentó baja incidencia de fagos para ambas bacterias, siendo *Lb. delbrueckii* la cepa más sensible a la infección. La leche cruda resultó ser la principal fuente de ingreso al proceso de fermentación, con títulos máximos de  $10^3$  UFP/mL. No se logró la amplificación del ADN vírico obtenido, sugiriendo que los oligos no corresponden a las especies analizadas durante el ensayo de especificidad. El fago control (ATCC 8014 – B2) logró identificarse con la metodología desarrollada, demostrando la eficiencia y sensibilidad de los ensayos de PCR.

Las perspectivas a trabajos futuros se orientan a la secuenciación y análisis del ADN vírico obtenido para su posterior clasificación. Al analizar las distintas muestras lácteas positivas a fagos, sería posible identificar las especies víricas presentes en la planta de procesamiento.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 La leche.

La leche es uno de los alimentos más antiguos utilizados por el hombre y constituye una parte importante de la dieta habitual, debido a su contenido alto de proteínas, vitaminas y minerales. La industria láctea es una industria global que juega un papel muy importante en el sector agrícola de países industrializados como aquellos en vías de desarrollo. En 2016 de acuerdo a la FAO se estimó una producción mundial de leche de 817 millones de toneladas. Sin embargo, las tendencias hasta 2025 sugieren que la producción de productos lácteos aumentará en un rango 6 - 20 % (OECD/FAO, 2016). De acuerdo a la Federación Internacional de Productos Lácteos (IDF, 2018), la producción global de leche (vaca y búfala) ha incrementado 2.2 % por año en los últimos 7 años (2010 - 2017) alcanzando un nivel de 849 millones de toneladas de leche producida en 2017. Los países desarrollados aportan dos tercios de la producción mundial y los países en vías de desarrollo sólo un tercio. La producción global de leche se realiza principalmente por cinco especies: vaca, búfala, cabra, oveja y camella. Sin embargo, la producción de leche de vaca representa un 83.1 % de la producción mundial. Un litro de leche proporciona el 100 % de calcio que requiere un humano adulto, 67 % del fósforo, 66 % de la vitamina B12, 49 % de la proteínas, 30 % de la vitamina A, 19 % de la vitamina C y 3 % del hierro (Spreer, 2017). Biológicamente, la leche es un líquido secretado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, tras el nacimiento de la cría y cuya misión es satisfacer los requerimientos nutricionales del recién nacido. Sin embargo, partiendo desde un punto de vista legal, la leche se considera un producto integro, no alterado ni adulterado y sin calostro, proveniente del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas (Gil, 2017). A lo largo de los años, diversos productos derivados de la leche han sido producidos y esta lista aumenta cada día. Antes de la industrialización de la leche, solamente se elaboraban productos que conservaban los componentes insolubles de la leche (caseínas y grasa) como la nata, mantequilla y quesos. Actualmente, las

posibilidades se han multiplicado y en el mercado pueden encontrarse desde leches condensadas, evaporadas, productos obtenidos del suero como el requesón, hasta otros productos obtenidos a partir de la fermentación de la leche (Spreer, 2017). En la actualidad, la elaboración de productos a base de leche ocupa el tercer lugar dentro del producto interno bruto de la industria alimentaria (SE, 2018).

### 1.2 Leches fermentadas: yogurt.

Las leches fermentadas se definen como productos elaborados a partir de leche de diferentes especies de animales, homogeneizada o no, tratada térmicamente y fermentada por microorganismos específicos. Las leches fermentadas reciben más de 400 nombres genéricos que difieren de acuerdo al tipo de leche utilizada (vaca, cabra, oveja y búfala) y de las especies microbianas utilizadas para su elaboración (Rodríguez y Martínez, 2014). La clasificación de las leches fermentadas toma en cuenta no sólo los microorganismos que dominan la microbiota, sino también los productos metabólicos producidos. Tipo I: constituidos por leches fermentadas en las que la fermentación es dirigida sólo por bacterias ácido lácticas. Tipo II: la fermentación es dirigida por bacterias ácido lácticas y levaduras. Tipo III: son aquellas cuya microbiota está formada por bacterias ácido lácticas mesófilas y por el hongo *Geotricum candidum* (Fox y col., 2017). El yogurt pertenece al tipo I. Debido a la composición compleja de la leche, en ésta pueden desarrollar diversos microorganismos, bacterias deterioradoras, patógenos y algunas otras propias de la leche como las bacterias ácido lácticas o BAL (Ly-Chatain y col., 2011). Estas últimas, son bacterias de importancia industrial ya que son empleadas en una amplia variedad de productos fermentados a partir de leche. La actividad acidificante es la función tecnológica más importante de las BAL. Esta capacidad además de las actividades proteolíticas y enzimáticas, guía la selección de cepas para dar forma a los cultivos iniciadores que muestran un comportamiento diferente de acuerdo con el producto deseado (Quiberoni y col., 2003). El yogurt es un producto lácteo fermentado que resulta del desarrollo de dos bacterias ácido lácticas termófilas, tradicionalmente: *Streptococcus thermophilus* y toda especie de *Lactobacillus*,

comúnmente *Lactobacillus delbrueckii* (FAO/WHO, 2011). *S. thermophilus* proporciona la acidez característica al producto y su temperatura óptima se encuentra entre 42 - 50 °C, mientras que *L. bulgaricus* se encarga de otorgar el aroma característico del yogurt y su temperatura óptima se encuentra entre 37 - 42 °C (FAO, 2014). Ambas BAL son inoculadas en proporción 1:1, su proporción después de la fermentación depende de las condiciones de producción. Durante la fermentación, las BAL realizan tres conversiones bioquímicas principales en los componentes de la leche: glicólisis (conversión de carbohidratos en ácido láctico u otros metabolitos), proteólisis (hidrólisis de caseínas en péptidos y aminoácidos) y lipólisis (desglose de la grasa de la leche en ácidos grasos libres). Ambos microorganismos crecen de manera sinérgica. Ambas BAL pueden crecer a pH bajos pero *S. thermophilus* crece mejor al inicio de la fermentación cuando el pH es alto. Conforme avanza la fermentación, el pH disminuye hasta valores inferiores de 5.5, la acidez y las sustancias producidas por *S. thermophilus* crean las condiciones óptimas para el desarrollo de *L. bulgaricus*. El bacilo libera aminoácidos de la caseína lo que estimula el crecimiento de *S. thermophilus* lo que favorece la producción de ácidos grasos y acetaldehído. La actividad de las proteinasas de *Streptococcus thermophilus* es mucho más débil que la de *L. bulgaricus*, pero las peptidasas de *Streptococcus thermophilus* pueden hidrolizar los productos intermedios de la proteólisis de caseína de *L. bulgaricus*. Los oligopéptidos resultantes son transportados a las células y luego las degrada en oligopéptidos más pequeños y aminoácidos. Los aminoácidos libres son usados para la síntesis de proteínas. *L. bulgaricus* es capaz de fermentar fructosa, galactosa, glucosa y lactosa, mientras que *S. thermophilus* puede fermentar glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa. Ambas BAL usan la lactosa como fuente de energía y la convierten en ácido láctico, esto conlleva a la disminución del pH. Además del ácido láctico se producen los compuestos relacionados al aroma, entre los más importantes se encuentran metabolitos como: acetaldehído, diacetilo y acetoína. También se obtienen ácidos volátiles como: acético, butírico, caproico, fórmico, isovalérico y propiónico (Chen y col., 2017; Rul, 2017). Otras bacterias empleadas en la fermentación de productos lácteos son del género *Lactococcus* y *Leuconostoc*, utilizar diferentes BAL generará características sensoriales diferentes,

cambiando el sabor y aroma del producto final. Se ha reportado que estos últimos géneros de BAL se utilizan como cultivos adjuntos para incrementar la calidad del sabor y el sabor de mantequilla del yogurt. Las cepas más utilizadas son *Lactococcus diacetylactis* y *Leuconostoc citrovorum* debido a su alta capacidad para metabolizar el citrato. Sin embargo, en muchos países la denominación “yogurt” sólo puede ser aplicada a productos elaborados específicamente con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Chen y col., 2017).

### 1.3 Problemas durante la elaboración de yogurt.

Durante la elaboración de yogurt o productos lácteos fermentados, existen diversos factores que pueden afectar la actividad de los cultivos iniciadores. Estos factores van desde variaciones en la composición de la leche a condiciones del proceso, y por lo tanto afectan los procesos de producción. Anudado a esto, un rango de inhibidores pueden estar presentes en la leche como: antibióticos, aglutininas, oxígeno disuelto, ácidos grasos libres, bacterias inhibidoras, sanitizantes residuales, bacteriocinas y bacteriófagos. Por ello, poseer procesos de control de calidad y buenas prácticas de manufactura ayudan a minimizar la influencia de estos factores en la industria de procesamiento de lácteos. Sin embargo, todavía pueden surgir problemas de los residuos de antibióticos, bacteriocinas y bacteriófagos (Fox y col., 2017). Uno de los problemas más comunes en el sector de productos lácteos fermentados es el ataque de bacteriófagos sobre las BAL, debido a que pueden arruinar lotes enteros produciendo grandes pérdidas económicas. Se ha reportado que la contaminación por bacteriófagos puede ser resultado del ambiente, la leche y maquinaria, principalmente (Quiberoni y col., 2003). Aunque en la leche cruda se encuentran en mínima cantidad, estos pueden proliferar rápidamente en presencia de BAL o cultivos iniciadores. Siendo los causantes más frecuentes de inhibición en el crecimiento de las bacterias lácticas. La presencia de bacteriófagos está asociada con todos los ambientes relacionados con la elaboración de productos lácteos. Su presencia da lugar a aumentos en los tiempos de los procesos, deterioro en la calidad de los productos y, en casos más graves, la ausencia total de actividad de las BAL

imposibilitando la formación de ácido láctico y la elaboración de los productos fermentados (Quiberoni y col., 2003).

#### 1.4 Bacteriófagos.

Los bacteriófagos, también conocido como fagos, son virus que destruyen a las bacterias al inducir la síntesis de estructuras especializadas capaces de transferir el material genético viral a otras células. Son partículas relativamente simples; poseen un tamaño pequeño que varía de 20 a 1,000 nm, siendo de menor longitud a una bacteria. Están compuestos por una cubierta proteica, denominada cápside, que rodea el material genético generalmente del tamaño de un plásmido (20 - 30 Kb). Contienen un único tipo de ácido nucleico ya sea ADN o ARN, pero no ambos. El ácido nucleico de un fago puede ser monocatenario o bicatenario, por lo tanto hay fagos con ADN o ARN bicatenario y ADN o ARN monocatenario. Además, dependiendo del tipo de fago la cadena de ácido nucleico puede ser lineal o circular. Por su simpleza los fagos poseen pocas o ninguna enzima metabólica propia, por lo que no pueden sintetizar proteínas o generar ATP. Debido a ello, para multiplicarse deben emplear la maquinaria metabólica de una célula que pueda actuar como hospedadora (Del Castillo y Mestres, 2004; Tortora y col., 2017). La morfología general de los fagos consiste en una cabeza, o cápside, en forma de prisma hexagonal bipiramidal que posee una cubierta proteica y dentro de la cual se localiza la información genética. Además, un cuello y una cola que son empleados para la inyección del material genético al interior de la célula huésped. Al final de la cola, una placa base y las espículas de la cola las cuales identifican los receptores situados en la pared celular de la bacteria y permiten la adhesión a esta (Fox y col., 2017). Los métodos tradicionales de extracción de ADN vírico incluyen etapas de precipitación, centrifugación, y el uso de reactivos y solventes peligrosos, además de ser tardados. Recientemente se han diseñado paquetes comerciales para la extracción de ADN vírico con el uso de columnas de sílica como es el caso de marcas como Qiagen y Norgen, sin el uso de solventes peligrosos y que son más rápidos. Por lo que sería interesante comparar de manera específica estos dos métodos aplicados a una empresa en particular.

### 1.5 Clasificación de bacteriófagos y especies comunes para *S. thermophilus* y *Lactobacillus*.

La clasificación de los virus ha sido descrita en base a diversos factores como la infección del huésped, la morfología, el tipo de genoma y las proteínas auxiliares que posee como las colas o envolturas. Actualmente, la clasificación más empleada divide a los bacteriófagos por morfología y características de los ácidos nucleicos, cuyo genoma puede ser ADN o ARN. La mayoría de los fagos poseen ADN de doble cadena o “dsADN”, mientras que un pequeño grupo cuenta con ARN de doble o simple cadena “dsARN y ssARN, respectivamente” o ADN de simple cadena “ssADN”. Considerando la morfología, los fagos se dividen en varios grupos; fagos icosaedros, fagos con o sin cola, fagos filamentosos o helicoidales y fagos con envolturas lipídicas. Los bacteriófagos sin cola incluyen dsADN cubierto por una envoltura de lipoproteína, dentro de una cápside y generalmente representado por partículas similares a virus en forma de gota. Aquellos que son helicoidales o filamentosos, incluyen fagos que son largos, rígidos o flexibles de longitud variable, generalmente tiene dsADN, se caracterizan por la combinación de una envoltura de lipoproteína y una forma de bastón, aunque algunos puede ser barras rígidas rectas sin envolturas. Los fagos con cápside icosaédrica generalmente tienen ssARN, aunque también pueden contener dsADN y ssADN, empaquetado en pequeñas cápsides formadas por la capa externa de proteínas con una bicapa lipídica interna y se parecen a enterovirus. Los fagos con cola se representan el 96 % de los fagos conocidos y poseen colas contráctiles que consisten en una vaina y un tubo central, colas largas y no contráctiles y colas cortas (Kurtböke, 2012).

Bradley en 1967 estableció una clasificación de bacteriófagos basada en su morfología y los tipos de ácidos nucleicos. Se ha reportado que en productos lácteos se encuentran bacteriófagos de orden *Caudovirales*, es decir, bacteriófagos con cola. Dentro de éste orden, se encuentran tres familias diferentes: *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*. Los bacteriófagos de la familia *Myoviridae* se caracterizan por tener una cola larga contráctil, en esta familia se encuentran los fagos de cola más grandes y más evolucionados. La familia *Siphoviridae* se caracteriza por tener una cabeza isométrica y una cola larga en forma de tubo simple

no contráctil. Por último, la familia *Podoviridae* consiste en fagos de cola corta y no contráctil. Los fagos son virus específicos debido a esto, dependiendo del tipo de bacterias que se encuentren en el medio, bacteriófagos de distintas familias tenderán a atacar. Los bacteriófagos de la familia *Myoviridae* atacan a *Lb. helveticus* y bacterias del género *Leuconostoc*. Mientras que los fagos que atacan a *Streptococcus thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* son pertenecientes a la familia *Myoviridae* o *Siphoviridae* (Fox y col., 2017). Como se mencionó anteriormente, los fagos pueden llegar hacer un gran problema en la elaboración de productos lácteos fermentados. Estos pueden lisar las células iniciadoras previniendo la producción de ácido, a este tipo de fagos se les conoce como “fago perturbador”. Entre los reportes de ataque de fagos sobre cepas utilizadas en fermentaciones lácticas, se encuentran las bacterias del género *Lactococci* y *Leuconostoc*; *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lb. helveticus* (Zago y col., 2006; Ly-Chatain y col., 2011; Marcó y col., 2012).

Los principales fagos presentes en productos lácteos son del orden de *Caudovirales* (fagos con cola), de las familias *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*, Figura 1 (Cota, 2016).

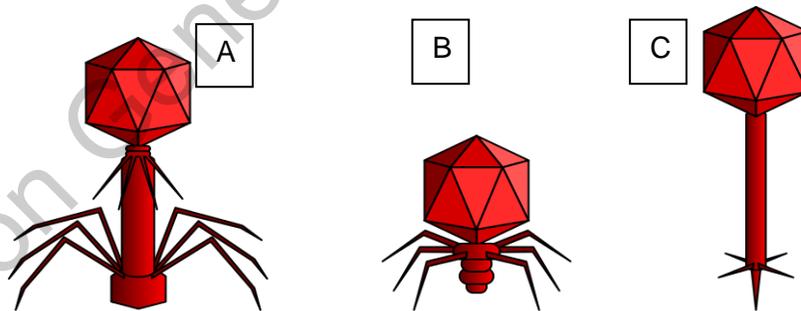


Figura 1. Principales fagos presentes en productos lácteos. A: *Myoviridae*, colas largas contráctiles; B: *Podoviridae*, colas cortas, no-contráctiles; C: *Siphoviridae*: colas largas no-contráctiles (Cota, 2016).

#### 1.6 Mecanismos de infección.

Los virus poseen dos fases con su ciclo de vida: fuera y dentro de la célula que infectan. Las partículas virales pueden sobrevivir fuera por un largo periodo en condiciones severas donde son conocidos como “virones”. Fuera de la célula, los

virus no son capaces de multiplicarse ya que carecen de la maquinaria para replicar su propio material genético y producir las proteínas necesarias para el proceso. Los mecanismos de infección de un bacteriófago pueden ser de dos tipos, dependiendo de la relación con la bacteria huésped: lítico y lisogénico. Sin embargo, en ambos casos el inicio del ciclo permanece constante (Salmond y Fineran, 2015). Todo comienza con el acercamiento del bacteriófago a los receptores específicos en la superficie de la pared celular de la célula huésped. Este proceso es altamente específico para cada cepa, debido a que los receptores, que están formados por sustancias proteicas e hidrocarbonadas, también son específicos de cada cepa bacteriana. La pared celular de las bacterias Gram positivas es una mezcla compleja de diferentes biopolímeros: peptidoglicano, polisacáridos, ácidos teicoicos, y proteínas. Siendo el peptidoglicano el principal componente, es una cadena de dos glicanos unidos mediante puentes intercatenarios a una cadena corta de péptidos. Existen numerables variaciones entre especies y cepas, constituyendo los determinantes específicos para la interacción con los bacteriófagos (Chapot-Chartier, 2014). En general, los receptores virales son moléculas normales de la célula huésped de superficie involucradas en funciones celulares de rutina, pero ya que una porción de un complejo molecular en la superficie viral (típicamente espigas) tiene una forma complementaria a la forma de la parte soluble externa del receptor, el virus es capaz de unirse al receptor y unirse a la superficie de la célula huésped. Después de la unión mediada por el receptor a su huésped, el virus debe encontrar una manera de ingresar a la célula. Tanto los virus envueltos como los no envueltos usan proteínas presentes en sus superficies para unirse y entrar a la célula huésped empleando el mecanismo de endocitosis (Kurtböke, 2012). Seguido a esto, en el ciclo lítico, el bacteriófago redirige el metabolismo de la bacteria huésped para que sintetice proteínas y ADN vírico. Dando una producción entre 2 - 300 nuevas partículas virales viables (bacteriófagos) dentro de la célula, esta producción depende de la susceptibilidad de los iniciadores en la etapa de desarrollo al ataque de los fagos. En adición, se da la producción de una enzima denominada "virolisina" que destruye la pared celular, por lo que la bacteria se lisa conforme el peptidoglicano de la pared es destruido y se da la liberación de los nuevos bacteriófagos al medio

que rodea la célula. Los cuales tienen la capacidad de infectar otras células disponibles en el medio. Este proceso puede durar entre 30 minutos y una hora después de la infección, según la temperatura (Figura 2). Por el contrario, en el ciclo lisogénico después de la inyección del material genético, este se establece en un sitio específico dentro del cromosoma del huésped y permanece inactivo (pro-fago). Por lo que esta secuencia vírica permanecerá en las células resultantes con cada ciclo de replicación de la célula huésped, sin que se genere lisis y liberación de bacteriófagos. Sin embargo, la generación de bacteriófagos e inducción a un ciclo lítico, puede ser inducida al someter la célula a estímulos como: radiación UV, temperaturas altas, entre otros factores (Tortora y col., 2017). Se ha reportado, que muchas de las cepas de bacterias ácido lácticas presentan un carácter lisogénico, principalmente *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Howard-Varona y col., 2017). Por lo que este tipo de iniciadores pueden ser considerados una posible fuente de bacteriófagos (Figura 2).

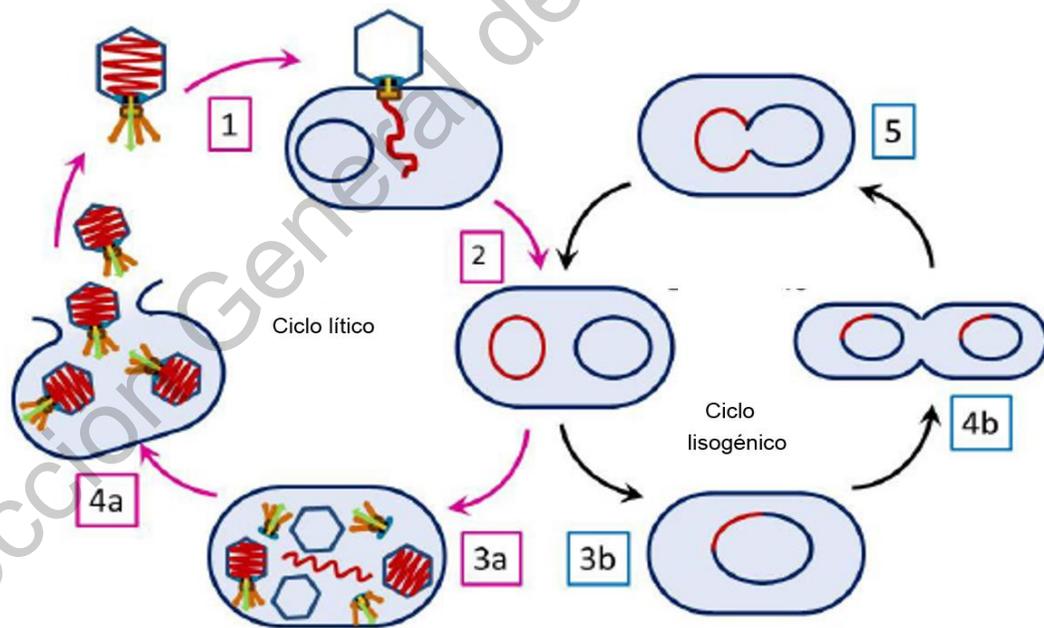


Figura 2. Ciclos de reproducción de bacteriófagos. 1 - El fago se une a la célula huésped e inyecta ADN; 2 - El ADN vírico entra en el ciclo lítico o lisogénico; 3a - Se sintetizan nuevas proteínas y ADN vírico, se ensamblan los viriones; 4a: lisis celular; 3b y 4b: integración del ADN vírico dentro del cromosoma bacteriano (profago) con la reproducción bacteriana normal; 5 - Bajo ciertas condiciones, el profago se extrae del cromosoma bacteriano e inicia el ciclo lítico (Kurtböke, 2012).

### 1.7 Interacción entre BAL y bacteriófagos.

Para que se lleve a cabo el proceso de infección de una bacteria, se deben de cumplir con condiciones específicas de temperatura, presencia de receptores específicos en la pared celular y cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) en el medio extracelular. Este último factor, se considera importante para la unión bacteriófago-bacteria. Ya que se favorecen el incremento de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática, haciendo más susceptible a la bacteria a una infección vírica al favorecer la unión y penetración (Cormier y Janes, 2014, Fox y col., 2017). Se ha reportado que algunos bacteriófagos que atacan bacterias ácido lácticas como; *S. thermophilus*, *Lb. fermentum*, *Lb. delbrueckii* y *Lactococcus lactis*, requieren de iones, principalmente calcio para su penetración a la bacteria hospedadora (Quiberoni y col., 2003; Zago y col., 2006; Zhang y col., 2006; Ly-Chatain y col., 2011). En cuanto a la temperatura, se ha reportado que los fagos mesófilos, es decir que atacan bacterias mesófilas, se multiplican mejor a 21 y 35 °C. Mientras que los fagos termófilos lo hacen mejor en un rango de 37 - 42 °C, pudiendo replicarse en condiciones aerobias, anaerobias o mixtas dependiendo del huésped. Los bacteriófagos cuya temperatura óptima de desarrollo es 35 °C se conocen como “fagos de leche cruda” ya que multiplican mejor en leche cruda o pasteurizada que en leche esterilizada. Esta infección a las bacterias ácido lácticas afecta principalmente la capacidad acidificante de los cultivos iniciadores y por lo tanto, la velocidad del proceso ocasionando severas consecuencias tecnológicas y comerciales. A pesar de que hay poca información cuantitativa sobre el nivel de bacteriófagos que afectan el proceso fermentativo, se ha reportado que una concentración de bacteriófagos de  $10^5$  UFP/mL en leche de vaca causa problemas evidentes en el proceso de acidificación para yogurt (Quiberoni y col., 2003). En leche de cabra los niveles encontrados van desde  $10^4$  a  $10^8$  UFP/mL y  $10^2$  a  $10^5$  UFP/mL para el suero resultante del proceso (Ly-Chatain y col., 2011). En la elaboración de queso se ha encontrado que  $6 \times 10^2$  -  $6 \times 10^5$  UFP/mL de leche son suficientes para retardar el proceso de acidificación (Fox y col., 2017). Como se observa, los niveles de bacteriófagos necesarios varía de una fuente a otra. Por lo cual la detección de

estos, no solo en leche, sino también en los cultivos iniciadores, suero, ambientes de proceso y en todos los nichos posibles dentro de la industria láctica es necesario.

#### 1.8 Fuentes de bacteriófagos en industria láctea.

Se sabe que la leche cruda es considerada la principal fuente de ingreso de bacteriófagos a las plantas procesadoras. Sin embargo, la contaminación del cultivo iniciador es mucho más importante que la contaminación de la leche, debido a que las partículas virales pueden ser liberadas a partir de cepas lisogénicas presentes en el cultivo (Fernández y col., 2017). En general, los fermentos naturales o artesanales como suero-fermento y leche-fermento contienen una alta concentración de bacteriófagos. A pesar de esto, muchas veces el efecto de estos sobre las bacterias no es percibido, ya que estos cultivos al ser una mezcla compleja de bacterias ácido lácticas tienen una continua selección de cepas resistentes a los mismos. Es decir, solo algunas de las cepas presentes sufren el ataque de los bacteriófagos y su efecto sobre la acidificación se ve enmascarado. A pesar de la amplia microbiota presente en los cultivos iniciadores, se ha reportado la presencia de enzimas líticas y lisinas producidas durante el ciclo de replicación de los bacteriófagos que actúan sobre cepas resistentes y son responsables de la inhibición de cultivos mixtos (Ly-Chatain y col., 2011; Salmond y Fineran, 2015). Es por ello que, el ingreso de bacteriófagos a plantas de procesamiento constituye un problema difícil de manejar, ya que la diseminación de estas partículas virales en el ambiente industrial es muy rápida.

#### 1.9 Estrategias de control en la industria láctea.

Debido al impacto económico que el problema de los bacteriófagos representa, diversas estrategias han sido tomadas por la industria de productos lácteos para evitar la contaminación por estas partículas. Además de la implementación de prácticas higiénicas se ha recurrido a diversos métodos para disminuir la probabilidad de infección. La rotación de cepas no relacionadas con bacteriófagos es la técnica más implementada en la industria láctea, además de la implementación de cultivos mixtos que contienen cepas que difieren en su sensibilidad a bacteriófagos. Por lo cual estos cultivos tienden a recuperarse rápidamente debido al crecimiento de las

cepas resistentes. Estos cultivos generalmente contienen BAL termófilas (*S. thermophilus* y *Lactobacillus*) y BAL mesófilas como cepas de género *Lactococcus* (Del Castillo y Mestres, 2004).

La pasteurización (75 °C por 15 s) ha sido una forma de controlar el crecimiento microbiano, sin embargo no es completamente efectivo para la inactivación de los bacteriófagos. Por ello, se ha implementado una combinación de factores como el uso de temperaturas altas en conjunto de fermentadores cerrados, una inoculación aséptica del cultivo iniciador así como una mínima manipulación de utensilios y equipamiento (Fox y col., 2017).

Entre los métodos químicos empleados se encuentran los tratamientos biocidas, los cuales son recomendados para la sanitización en las industrias. Los agentes más empleados son hipoclorito de sodio, etanol y ácido peracético. Sin embargo, su eficiencia en la activación de bacteriófagos no es completa ya que depende mucho de la concentración permitida a emplear y la resistencia de las partículas virales a dicho agente (Reinheimer y Zalazar, 2007). En las últimas décadas, se han recurrido a la implementación de cultivos iniciadores resistentes a los bacteriófagos, que han sido obtenidos por diversos métodos biotecnológicos. Las empresas dedicadas en la venta de cultivos iniciadores proporcionan bacterias resistentes y recomiendan mezclar cepas diferentes, junto con el cambio periódico del cultivo para disminuir la probabilidad de infección (Del Castillo y Mestres, 2004). Sin embargo, ninguna de estas estrategias ha sido totalmente efectiva. Una detección temprana y específica del bacteriófago en la leche que será utilizada es la mejor medida para evitar las pérdidas económicas.

#### 1.10 Métodos de detección.

Se han desarrollado diversos métodos para la detección y caracterización de los fagos. Un nivel de bacteriófagos que se considera seguro y aceptable debe ser inferior a  $10^5$  UFP/mL. Los sistemas para la detección de fagos se agrupan principalmente en dos estrategias. La primera estrategia consiste en ensayos microbiológicos, los cuales se basan en mostrar la presencia del fago por visualización directa de los viriones (ensayo directo) o detectar el efecto inhibitorio

de los cultivos iniciadores (ensayo indirecto). Existe una amplia variedad de ensayos microbiológicos, entre los cuales se encuentran: ensayo de punto/placa, test de la turbidez o crecimiento, medida de impedancia o conductancia, detección citometría de flujo y microscopía electrónica. El ensayo de punto/placa es un método sensible, consiste en disolver parte de la muestra en medio o solución isotónica y remover el resto de células bacterianas por centrifugación y filtración. Parte de esta muestra junto con la cepa iniciadora se colocan en la parte de arriba de una placa con agar suave. Después de la incubación a condiciones óptimas se observará zonas claras o de lisis, donde el crecimiento de la bacteria iniciadora fue inhibido, indicando la presencia de bacteriófagos (Cormier y Janes, 2014). El ensayo de turbidez o crecimiento se basa en los efectos del bacteriófago sobre la bacteria iniciadora. Lo cual se refleja en la inhibición de su crecimiento y en la disminución de la acidez, en esta prueba se coloca muestra filtra junto con cultivo iniciador líquido, después del crecimiento, la absorbancia o el pH son analizados y comparados con un control (no se añade muestra, sólo el cultivo iniciador). La medida de la impedancia o conductancia consiste en la medición de la conductancia de los cultivos, es un método parecido a la prueba de turbidez. El método de detección por citometría de flujo consiste en la detección de las células infectadas, esto es posible ya que el desarrollo de bacteriófagos causa efectos detectables en la densidad de la pared celular de las bacterias (Michelsen y col., 2007). Por último, la microscopía electrónica consiste en observar directamente la muestra con la correcta amplificación algunos de estos métodos son ampliamente usados en plantas de procesamiento de todos los tamaños. Sin embargo, en diferentes plantas ya se usan métodos más rápidos y automatizados.

La segunda estrategia son los ensayos moleculares, los cuales tratan de demostrar la presencia del fago por medio de la detección de distintas partes de la partícula vírica, en este caso se busca el ADN genómico o la envoltura proteica que los protege. Las técnicas moleculares pueden reducir los tiempos de análisis, además de ser más específicos que los métodos moleculares. Los ensayos inmunológicos (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, ELISA) se desarrollaron para detectar algunas de las principales proteínas de la envoltura proteica (cápside) de algunos

fagos de *Lb. lactis*. El ADN vírico puede ser detectado por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por sondas específicas. El ensayo ELISA se basa en el uso de anticuerpos contra las principales proteínas estructurales del virón, a pesar de ser uno de los métodos más rápidos presenta una sensibilidad insuficiente. La hibridación de ADN puntual fue uno de los primeros métodos desarrollados para la detección de ADN vírico, en la industria no se utiliza debido al tiempo que conlleva y la necesidad de personal entrenado. La técnica de PCR permite la amplificación exponencial específica de una secuencia dada comprendida entre dos oligonucleótidos en una reacción cíclica en un termociclador. Esta técnica es de las más empleadas debido a que su límite de detección se encuentra por debajo del nivel de bacteriófagos que se considera seguro. Otras ventajas de esta técnica son la capacidad de procesar diversas muestras al mismo tiempo y la posibilidad de detectar el tipo de bacteriófago en la muestra por medio de tipificación, estableciendo una relación entre la región amplificada y la cepa iniciadora. Con la posibilidad de reconocer el tipo de fago detectado, es posible diseñar un sistema de rotación de cultivos. Otros métodos útiles han sido desarrollados a partir de éste método como la PCR múltiple y PCR en tiempo real. La PCR múltiple presenta la ventaja de poder detectar más de un fago en la misma reacción, lo cual resulta útil para los cultivos mixtos donde más de un fago puede estar presente. Por último, la PCR en tiempo real nos permite cuantificar aproximadamente el número de copias del gen objetivo en una muestra, además de que es un método más sensible y que requiere el menor tiempo de procesamiento comparado con el resto de las técnicas PCR. Actualmente, las técnicas moleculares son ampliamente utilizadas en la industria debido a su alto rendimiento. Estas pruebas son útiles para detectar fuentes de contaminación en las instalaciones de fermentación e identificar las especies de fagos detectadas (Martin y col., 2008).

## **2. HIPÓTESIS**

La aplicación de ensayos microbiológicos y moleculares en conjunto permitirá una identificación de los bacteriófagos en muestras de una industria láctea productora de yogurt. El aislamiento de ADN vírico por el método molecular usando un paquete comercial de aislamiento de bacteriófagos puede ser tan eficiente como el método alternativo reportado.

### 3. OBJETIVOS

#### **Objetivo General**

- Aplicar ensayos microbiológicos tradicionales (ensayo de punto/placa) y moleculares (PCR) para la detección, así como la identificación de bacteriófagos en muestras de una empresa productora de yogurt.

#### **Objetivos Específicos**

- Realizar un muestreo en puntos críticos del proceso de elaboración de yogurt en una empresa.
- Llevar a cabo el aislamiento de los cultivos iniciadores utilizados y realizar su conserva, así como sus curvas de crecimiento.
- Aplicar ensayos microbiológicos tradicionales (ensayo de punto/placa) para la detección de bacteriófagos.
- Aplicar ensayos moleculares (PCR) para la detección de bacteriófagos mediante el diseño de oligonucleótidos y seleccionar las condiciones de reacción.
- Comparar la eficiencia para el aislamiento de ADN vírico de bacteriófagos utilizando un paquete comercial (Norgen®) y un método molecular alternativo.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales.

#### 4.1.1 Material biológico.

Se analizaron muestras de leche sin pasteurizar de vaca, producto en tanque de fermentación, yogurt (bebible y batido), superficies de trabajo y agua de lavado de tanques obtenidas de una empresa productora de yogurt comercial (Sigma Alimentos) localizada en la ciudad de Guadalajara, Jalisco.

#### 4.1.2 Material para método microbiológico tradicional.

Se realizó un aislamiento de los cultivos iniciadores utilizados para la producción del yogurt y se realizó su conservación a largo plazo dentro de la colección del Laboratorio de Biotecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro. Cada cultivo fue muestreado de forma independiente mediante la selección de un lote (congelado y liofilizado) de los disponibles en la cámara de refrigeración de la empresa. Los cultivos iniciadores aislados *Lb. delbrueckii* y *S. thermophilus* fueron utilizados como bacterias huésped. Como control del método, se utilizó una bacteria de colección *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 y su bacteriófago específico ATCC 8014 - B2 (Colección Americana de Cultivos, EUA). Se utilizó medio MRS suplementado con  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgSO}_4$  para el desarrollo de *Lb. delbrueckii* y medio M17 suplementado con  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  y lactosa para el desarrollo de *S. thermophilus* (Quiberoni y col., 2003; Zhang y col., 2006; Ly-Chantain y col., 2011).

#### 4.1.3 Material para método microbiológico molecular.

Para la extracción de ADN de bacteriófagos se empleó un paquete de aislamiento por cromatografía en columna con centrifugación marca Norgen (Phage isolation kit, Biotas. Cat 46800) y el método reportado por Zago y col., (2006) basado en la peletización/centrifugación de las partículas de bacteriófagos y la posterior extracción de ADN. Para este último método se empleó SDS (dodecilsulfato sódico, BioRad),

ribonucleasa A (10 mg/mL, Sigma- Aldrich), fenol Tris saturado (Invitrogen), cloroformo, isoamilalcohol (J. T. Baker), isopropanol y etanol (Sigma Aldrich). El análisis del material genético, se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa empleando bromuro de etidio como agente de tinción, marcador 1 Kb ADN Plus (Invitrogen), amortiguador de carga Naranja G 5X (BioRad) y amortiguador TAE (Tris-acetato-EDTA) 10X. Para la amplificación del ADN, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando amortiguador para PCR 10X, mezcla de dNTP's 10 mM, taq polimerasa (5 U/ $\mu$ L), MgCl<sub>2</sub> 50 mM, oligo F 10 pM, oligo R 10 pM y agua destilada estéril (Zago y col., 2006; Sambrook y Russell, 2012).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Preparación de conservas.

El aislamiento de los cultivos iniciadores y su conserva a largo plazo en chaquiras de vidrio se llevó a cabo de acuerdo al método reportado por la Sociedad Americana de Microbiología (ASM por sus siglas en inglés) (Gherna, 1994). Para la activación de las cepas, se colocaron dos chaquiras de cada una en 5 mL de medio correspondiente y se incubaron por 24 h de acuerdo al Cuadro 1. Se tomó una alícuota de la bacteria y se inoculó mediante estriado en una caja con agar del medio correspondiente, incubando el tiempo necesario para su desarrollo. Este proceso se realizó dos veces para asegurar tener un cultivo puro. Posteriormente, se inocularon en tubos con agar inclinado y se incubaron por 12 h. Las colonias se removieron del agar con solución estéril de glicerol-leche descremada 1:1. Se cubrieron las chaquiras estériles con la suspensión de cepa. Se transfirieron 2 - 4 chaquiras a microtubos estériles y se almacenaron a - 70 °C para su conservación y uso posterior.

Cuadro 1. Condiciones de cultivo e incubación para cultivos iniciadores.

Cepa	Medio de cultivo	Suplemento	pH	Temperatura de incubación (°C)	Referencia
<i>Lb. delbrueckii</i>	MRS	MgSO <sub>4</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub> 10mM	6.9	37.0	Zhang y col., 2006
<i>S. thermophilus</i>	M17	MgSO <sub>4</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM Lactosa 10 % p/v	5.7	42.0	Quiberoni y col., 2003; Ly-Chantain y col., 2011

#### 4.2.2 Elaboración de curva de crecimiento.

Se tomó una conserva de *Lb. delbrueckii* y *S. thermophilus* se colocó en un tubo con el medio correspondiente y se incubaron. Se midió la absorbancia a 600 nm, empleando un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific), cada 2 h durante 12 h. Se empleó un blanco que consiste en el medio sin inocular para ajustar el espectrofotómetro. Con los datos obtenidos se construyó la curva de crecimiento; absorbancia (eje Y) y tiempo de incubación (eje X). Con los datos de las curvas de crecimiento, se definieron los tiempos de incubación para la propagación de los bacteriófagos y su detección por el método de punto/placa.

#### 4.2.3 Detección de bacteriófagos por método microbiológico

Se realizó una activación de las cepas aisladas a partir de cultivos liofilizado y congelado de *Lb. delbrueckii* y *S. thermophilus*, empleando los medios y condiciones correspondientes (Cuadro 1) y se incubaron por 24 h. Se realizó una segunda activación tomando una alícuota de la primera activación e incubando por 8 h aproximadamente. Posteriormente, al obtener los microorganismos en fase exponencial, se tomó una alícuota de la segunda activación y se incubó nuevamente. Los tiempos fueron establecidos con base en los datos obtenidos de la curva de crecimiento.

Para la detección de bacteriófagos, empleando las condiciones correspondientes de acuerdo a la cepa usada (Cuadro 1), las muestras de leche, producto en tanques, yogurt, superficies y agua de lavado se inocularon con cada una de las cepas huésped por separado. Para ello, se tomó 1 mL o 1 g de muestra dependiendo de su estado y se colocó en un tubo con 10 mL del medio suplementado correspondiente y 100  $\mu$ L del microorganismo en fase exponencial. Se incubaron por 6 h. Posteriormente, el tubo inoculado se centrifugó a 4,000 rpm por 5 minutos, se tomó 100  $\mu$ L del sobrenadante y se inoculó en un nuevo tubo con medio y bacteria. Se incubó por 6 h. La secuencia anterior se repitió dos veces más. El sobrenadante final se filtró por una membrana de 0.45  $\mu$ m para obtener un concentrado de bacteriófagos. Se realizaron las diluciones con agua peptonada hasta  $10^{-1}$  del sobrenadante filtrado. Para la detección de bacteriófagos se utilizó el método de doble capa, también conocido como método de superposición de agar suave. Para esto, se vertió agar 1.5 % p/v del medio suplementado correspondiente sobre una caja petri y se dejó solidificar. Posteriormente, se mezcló en un tubo con 5 mL de agar suave 0.7 % p/v suplementado con sales, 1 mL de muestra y 100  $\mu$ L de bacteria huésped. Las placas se incubaron por 12 h. Finalmente, se buscó y cuantificó el número de placas o zonas lisis presentes en cada caja petri. Se consideró como zona de lisis o placa, toda sección sobre el agar donde el crecimiento de la bacteria hubiera cesado y presentará una apariencia clara o traslúcida con forma circular o semicircular (Fox y col., 2017).

4.2.4 Aislamiento del ADN vírico de bacteriófagos utilizando el paquete de aislamiento de ADN de bacteriófagos Norgen (Phage isolation kit, Biotek. Cat 46800).

Para el aislamiento, se transfirió 1 mL del sobrenadante de fago clarificado, obtenido previamente a partir del líquido de cultivo con bacterias, a un tubo de 5 mL. Se añadieron 500  $\mu$ L de amortiguador lisis B y se agitó vigorosamente. Se incubaron los tubos durante 5 min a 65 °C, ocasionalmente se agitaron durante 2 o 3 veces. Posteriormente, se añadieron 320  $\mu$ L de isopropanol y se agitó. Se ensambló una columna de sílica (provista por el paquete), se añadieron 650  $\mu$ L del lisado y se

centrifugó durante 1 min a 6,000 g, se descartó el líquido filtrado y se repitió el proceso de centrifugación de lisado nuevamente hasta que se filtró todo el líquido. Posteriormente, se aplicaron 400  $\mu$ L de solución de lavado A en la columna y se centrifugó a 6,000 g, se descartó el líquido filtrado y se lavó la columna dos veces más. La columna se centrifugó durante 2 min a 14,000 g para secar la sílica. Se ensambló la columna en un nuevo tubo de elución y se añadieron 25  $\mu$ L de agua destilada estéril, se centrifugó durante 1 min a 6,000 g. El ADN obtenido se almacenó en congelación a - 20 °C.

#### 4.2.5 Aislación de ADN vírico de bacteriófagos por método molecular alternativo.

La extracción se realizó con base en el procedimiento reportado por Zago y col., (2006) con algunas modificaciones. Para ello, a 50 mL del sobrenadante de fagos clarificado se añadió 1 mL de amortiguador de lisis y se mezcló vigorosamente. Se llevó a incubación por 15 min a 65 °C con mezclado ocasional. Se adicionaron 100  $\mu$ L de ribonucleasa (1  $\mu$ g/mL) al lisado y se incubó 30 min a 37 °C. Se centrifugó a 8,000 g por 1 hora a 4 °C. Al finalizar, una pastilla celular fue visible en el fondo del tubo del cual cuidadosamente se descartó el sobrenadante. La pastilla se disolvió en 250  $\mu$ L de EDTA 40 mM y 250  $\mu$ L de SDS (10 g/L). Disuelta la pastilla celular, se adicionaron 500  $\mu$ L de fenol Tris saturado a 4 °C, se mezcló vigorosamente hasta completar una emulsión entre la fase orgánica y acuosa. Finalmente, se centrifugó a 3,000 g por 5 min. La fase acuosa fue extraída y colocada en un nuevo tubo. Posteriormente, se realizó la extracción de la fase acuosa por duplicado con un volumen de 500  $\mu$ L de cloroformo:isoamil alcohol 24:1 respectivamente. Para precipitar el ADN, se adicionó 1 mL de isopropanol a 4 °C, se dejó 30 min en refrigeración y se centrifugó a 8,000 g por 20 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 70 % v/v. Nuevamente se centrifugó a 8,000 g por 15 min y se eliminó el etanol en desecador (< 37 °C). Finalmente, se resuspendió en 120  $\mu$ L de amortiguador de elución y se almacenó a - 20 °C para su uso posterior.

4.2.6 Cuantificación del ADN vírico extraído del sobrenadante clarificado de bacteriófagos.

Se cuantificó la concentración de ADN en las muestras mediante el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), usando agua destilada como blanco. Para ello se colocó una gota de suspensión de ADN sobre el pedestal del equipo, se cerró la tapa y se realizó la lectura. Posteriormente, se limpió el pedestal con una toallita de laboratorio. Con base en los resultados obtenidos, se definió el volumen de muestra necesario para la PCR, considerando 100 ng/ $\mu$ L como la cantidad mínima requerida.

4.2.7 Evaluación de la calidad e integridad del ADN vírico extraído.

Se elaboró un gel de agarosa al 1 % p/v empleando amortiguador TAE 1X como diluyente, se calentó la solución a ebullición para favorecer la solubilización y se temperó. Se adicionaron 2  $\mu$ L de bromuro de etidio y la solución se vertió sobre la cámara de electroforesis. Tras su gelificación, la cámara se llenó con amortiguador TAE 1X y las muestras se colocaron en los pozos del gel, al igual que un marcador de peso molecular de 1 Kb. La corrida se realizó aplicando 70 V durante 1 hora. Para la visualización de las bandas, el gel se colocó en un fotodocumentador (Red SA-100, Alpha Innotech). Con base en los resultados, se definió la integridad del ADN (Sambrook y Russell, 2012). La muestra con la mejor integridad y mayor cantidad de ADN fue seleccionada para realizar la reacción de PCR, igualmente se tomó en cuenta la relación 260/280 y 260/230 obtenida en el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Se consideró como aceptable un rango de 1.8 a 2.0 unidades para la relación 260/28, mientras que para la relación 260/230 el rango de aceptación fue de 2.0 a 2.2 unidades. Ambos rangos indican buena calidad y pureza del ADN.

4.2.8 Reacción de en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción de PCR se realizó usando los pares de oligos diseñados a partir de las secuencias disponibles en la base de datos (Centro Nacional de Información Biotecnológica, NCBI por su siglas en inglés) de los fagos más comúnmente presentes en cultivos iniciadores (*Lactobacillus delbrueckii*) de leche fermentada tipo yogurt (Cuadro 2). Todos los oligos fueron provistos por IDT (Tecnologías Integradas

de ADN). El control y la muestra positiva seleccionada [fago *Lactobacillus delbrueckii* congelada Loma Alta (LbB LA)] aquella que presentó lisis en el proceso de detección de fagos, fueron preparadas con los reactivos de reacción de PCR para un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L. Un control negativo (sin fagos) fue incluido en todas las reacciones. Un termociclador (MJ Mini PTC1148, Bio Rad) se usó para llevar a cabo las reacciones bajo las siguientes condiciones: 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 50 °C, 1 min a 72 °C y un paso final de 7 min a 72 °C seguido de un enfriamiento a 4 °C (Zago y col., 2006). Los productos se separaron en un gel de agarosa al 1 % p/v usando amortiguador TAE 1X, teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV en un fotodocumentador.

#### 4.2.9 Optimización de condiciones de PCR: gradiente de temperatura.

La optimización de la reacción de PCR se realizó con una mezcla de reacción de 25  $\mu$ L de volumen final empleando la muestra positiva seleccionada y el control. El gradiente de temperatura de alineamiento se definió mediante el software disponible en el termociclador, empleando rangos de acuerdo al par de oligos a usar, siendo: 50 - 60 °C para los pares TAIR/TAIF y B2R/B2F y 55 - 65 °C para el par MHR/MHF. Las reacciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a la temperatura del gradiente, 1 min a 72 °C y un paso final de 7 min a 72 °C seguido de un enfriamiento a 4 °C (Zago y col., 2006). Un control negativo, es decir sin bacteriófagos fue incluido en todas las reacciones.

El producto de PCR se separó en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador con luz UV. Se determinó la mejor temperatura de alineamiento para observar el producto de PCR, con base en la banda integra definida con mayor intensidad lumínica observada.

Cuadro 2. Lista de oligos usados en la PCR.

Oligo	Secuencia (5' - 3')	Fago	Amplicón (pb)	Referencia
B2F	AGCCATTGTACCGTCAGATAAG	ATCC 8014 - B2	999	Este trabajo
B2R	GCAGACCCGTTAGGAGATAAAG	ATCC 8014 - B2	999	Este trabajo
MHF	GAATGACTTGATTACTCGTGCG	P1174, Ld17, Ld25A, phiLdb, c5	495	Casey y col., 2014
MHR	GCGTGATGGACTTGAACGTACC	P1174, Ld17, Ld25A, phiLdb, c5	495	Casey y col., 2014
TAIF	GTAGCTGAGCAAATGCAAAGTG	Ld3, Ld17, c5	899	Casey y col., 2014
TAIR	GCTTGCATTATCGGATTTGTCG	Ld3, Ld17, c5	899	Casey y col., 2014

#### 4.2.10 Optimización de condiciones de PCR: gradiente de cloruro de magnesio.

La optimización de la reacción de PCR se realizó con una mezcla de reacción de 25  $\mu$ L de volumen final empleando la muestra positiva seleccionada y el control. El gradiente de cloruro de magnesio empleado abarcó de 4.0 a 8.0 mM con incrementos de 0.5 mM. Las reacciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a la temperatura de alineamiento obtenida en el gradiente anterior, 1 min a 72 °C y un paso final de 7 min a 72 °C seguido de un enfriamiento a 4 °C (Zago y col., 2006). Un control negativo (sin fagos) fue incluido en todas las reacciones. El producto de PCR se separó en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador con luz UV. Se determinó la mejor concentración de MgCl<sub>2</sub> para observar el producto

de PCR, con base en la banda integra definida con mayor intensidad lumínica observada.

#### 4.2.11 Diseño experimental.

Toda metodología aplicada durante el ensayo se realizó por triplicado, determinando la desviación estándar con base en los datos obtenidos de las replicaciones.

La metodología completa y las partes que se realizaron por cada tesista se ilustran en la Figura 3.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

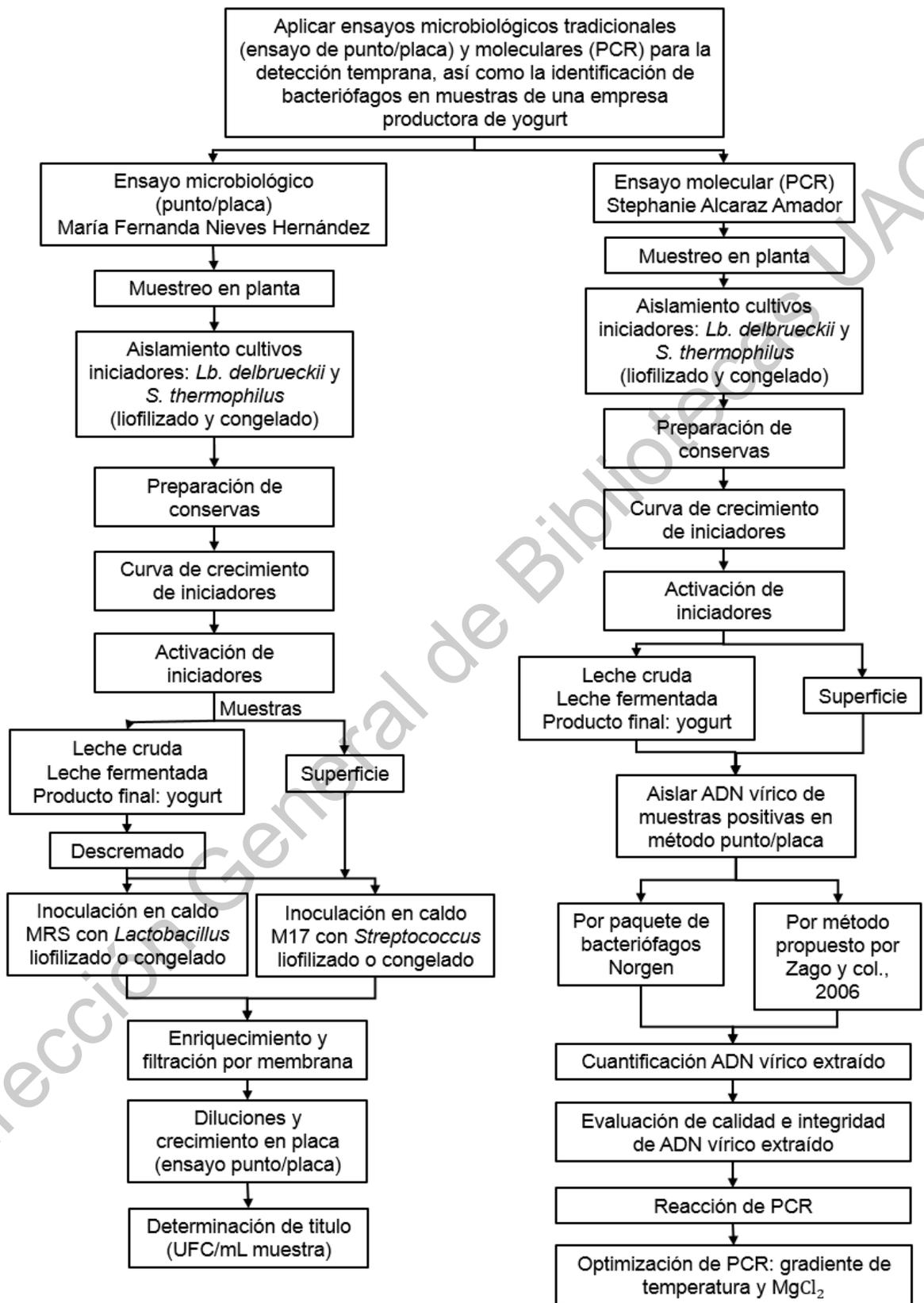


Figura 3. Resumen de metodología.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Curvas de crecimiento de *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* y *Lb. plantarum*.

Para determinar el tiempo de incubación necesario para que las bacterias alcancen su fase logarítmica, se elaboraron las curvas de crecimiento de cada bacteria usada. Las curvas de crecimiento obtenidas para *Lb. delbrueckii*, *Lb. plantarum* y *S. thermophilus*, se muestran en la Figura 4, 5 y 6, respectivamente.

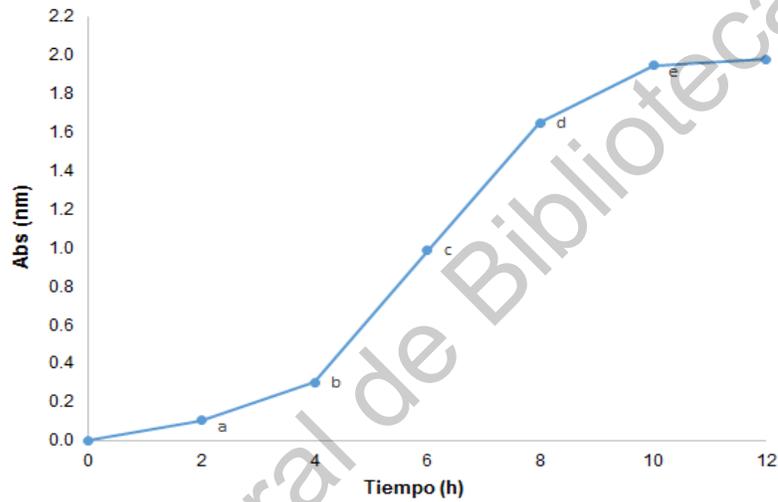


Figura 4. Curva de crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* en medio MRS suplementado con  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$ . Desviación estándar: a:  $\pm 0.002$ ; b:  $\pm 0.003$ ; c:  $\pm 0.003$ ; d:  $\pm 0.002$ ; e:  $\pm 0.002$ ; f:  $\pm 0.003$ .

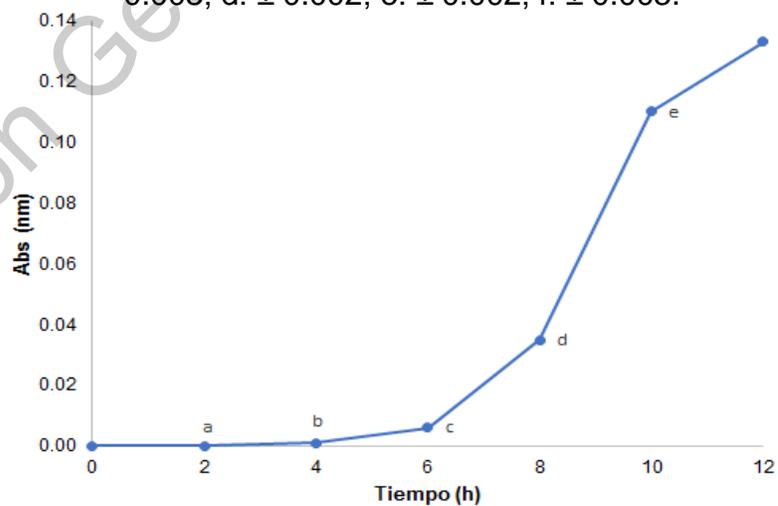


Figura 5. Curva de crecimiento de *S. thermophilus* en medio M17 suplementado con  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  y lactosa. Desviación estándar: a:  $\pm 0.000$ ; b:  $\pm 0.001$ ; c:  $\pm 0.002$ ; d:  $\pm 0.001$ ; e:  $\pm 0.002$ ; f:  $\pm 0.002$ .

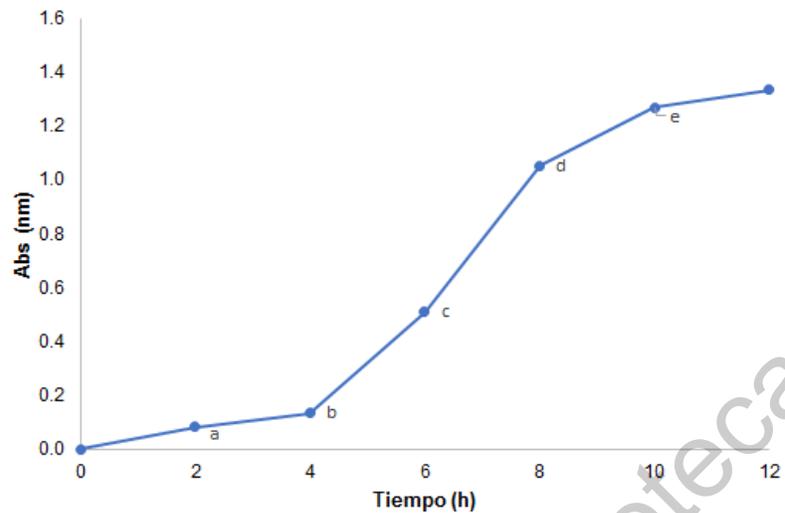


Figura 6. Curva de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* en medio MRS suplementado con  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$ . Desviación estándar: a:  $\pm 0.001$ ; b:  $\pm 0.001$ ; c:  $\pm 0.001$ ; d:  $\pm 0.003$ ; e:  $\pm 0.004$ ; f:  $\pm 0.002$ .

Con base a las curvas de crecimiento obtenidas, se determinó un tiempo de incubación de 6 horas para *Lb. delbrueckii* y *Lb. plantarum*, mientras que para *S. thermophilus* se estableció como 8 horas. Este tiempo de incubación se utilizó en el método microbiológico de doble capa para la detección de bacteriófagos en las 20 muestras recolectadas de leche, producto en tanque de fermentación, producto final y ambiente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Muestras recolectadas en la planta Sigma Alimentos.

Muestras ambientales	Materia prima	Producto en tanques de fermentación	Producto final
Superficie 1	Leche 1	Batido 1	Yogurt 1
Superficie 2	Leche 2	Batido 2	Yogurt 2
Superficie 3	Leche 3	Batido 3	Yogurt 3
Agua 1	Leche 4	Batido 4	Yogurt 4
	Leche 5	Batido 5	
	Leche 6	Batido 6	

## 5.2 Detección de bacteriófagos por método microbiológico.

El método de doble capa permite identificar muestras presuntamente positivas por la presencia de bacteriófagos caracterizadas por la formación de zonas de lisis en la superficie del agar donde se presencia el crecimiento bacteriano (Figura 7 y 8).

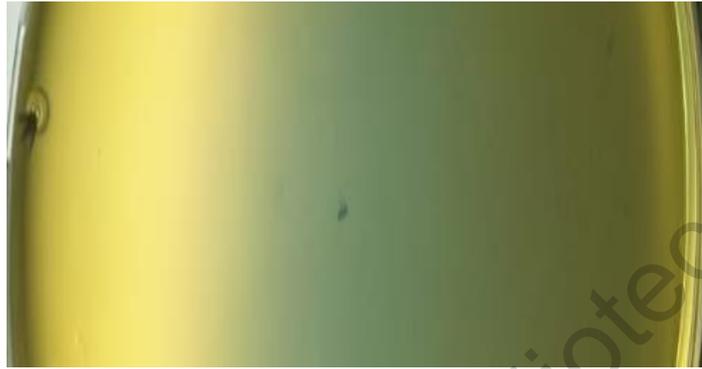


Figura 7. Zona de lisis sobre *Streptococcus* liofilizado usando batido 6.



Figura 8. Zonas de lisis sobre cepa *Lb. plantarum* usando el fago específico ATCC 8014 - B2.

Los resultados obtenidos para todas las muestras con cada microorganismo utilizado (liofilizado y congelado) se encuentran registrados en el Cuadro 4. Como se aprecia, la mitad de las muestras presentaron zonas de lisis con al menos uno de los huéspedes. En general, las clonas de *Lb. delbrueckii* presentaron una incidencia mayor de lisis, siendo lisadas por 11 de las 20 muestras probadas. Mientras que las clonas de *S. thermophilus* solo presentaron lisis con 2 de las 20 muestras usadas en los ensayos. Los resultados positivos para *Lb. delbrueckii* fueron obtenidos utilizando mayormente muestras de leche y batido, mientras que solo una de las muestra de

superficies de trabajo presentó lisis de la cepa huésped. Resultados negativos fueron obtenidos al utilizar muestras de yogurt, agua de lavado y en la mayoría de las muestras recolectadas en superficies.

Cuadro 4. Resultados del método de doble capa para la detección de fago en muestras.

Muestra	<i>Lactobacillus</i>		<i>Streptococcus</i>	
	Liofilizado	Congelado	Liofilizado	Congelado
Leche 1	-	+	+	-
Leche 2	-	+	-	-
Leche 3	+	+	-	-
Leche 4	-	-	-	-
Leche 5	-	+	-	-
Leche 6	-	-	-	-
Batido 1	+	+	-	-
Batido 2	-	-	-	-
Batido 3	-	+	-	-
Batido 4	-	+	-	-
Batido 5	+	-	-	-
Batido 6	+	-	+	-
Yogurt 1	-	-	-	-
Yogurt 2	-	-	-	-
Yogurt 3	-	-	-	-
Yogurt 4	-	-	-	-
Superficie 1	-	-	-	-
Superficie 2	-	-	-	-
Superficie 3	+	-	-	-
Agua 1	-	-	-	-

+ : Positiva a fagos (lisis en placa)

- : Negativa a fagos (no lisis en placa)

### 5.3 Cuantificación de ADN vírico extraído del sobrenadante clarificado de bacteriófagos.

La extracción del ADN vírico de las 12 muestras positivas y de la muestra viral de *Lb. plantarum* se realizó con el paquete y el método alternativo. Posteriormente, se cuantificó con el equipo Nanodrop, determinando la relación 260/280 y 260/230 que indica la pureza de los ácidos nucleicos. En el Cuadro 5 se muestra los datos obtenidos para el ADN extraído utilizando el paquete y el método alternativo. Las concentraciones obtenidas de ADN extraído por el paquete son hasta 10 veces menores a las obtenidas extrayendo el ADN por el método alternativo. En el caso del ADN extraído por el paquete, el control y la muestra leche 3 son las que tienen una concentración de ADN más alta siendo de 2,251.6 y 276.4 ng/ $\mu$ L, respectivamente. Por otro lado, la concentración mayor de ADN vírico extraído con el método alternativo fue utilizando la muestra la leche 5 con 19,389.2 ng/ $\mu$ L. Aunque una concentración alta de ADN es deseable para facilitar la posterior visualización del ADN en la electroforesis de gel de agarosa y su amplificación mediante PCR, también es importante considerar los valores de índice de pureza dados por las relaciones 260/280 y 260/230. Un valor cercano a 1.8 en la relación 260/280 y 2.0 - 2.2 en la relación 260/230 indican una buena pureza del ADN. Al analizar los datos obtenidos, se observa una tendencia a obtener un ADN más puro utilizando el paquete ya que la mitad de las muestras tienen una relación 260/280 cercana a 1.8, ninguna de las muestras de ADN obtenidas por el método alternativo tiene un valor cercano al objetivo. En cuanto a la relación 260/230, los únicos valores cercanos a 2.0-2.2 son los obtenidos para el ADN del control *Lb. plantarum* extraído tanto con el paquete y el método alternativo, y para el ADN de la muestra de la leche 1 extraído con el método alternativo.

Cuadro 5. Concentración de ADN, relación 260/280 y 260/230 para el ADN de las muestras positivas extraídas por el paquete y el método alternativo.

<b>Paquete</b>						
Lb	Muestra	Concentración (ng/μL)	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	260/280	260/230
C	Leche 1	46.2	0.923	0.504	1.83	1.02
C	Leche 2	195.0	3.900	2.232	1.75	0.99
C	Leche 3	276.4	5.528	3.016	1.83	1.15
C	Leche 5	207.5	4.149	2.324	1.79	0.82
C	Batido 1	74.0	1.480	0.937	1.58	0.67
C	Batido 3	71.7	1.435	0.942	1.52	0.75
C	Batido 4	179.1	3.582	1.958	1.83	0.86
L	Leche 3	229.2	4.584	2.344	1.96	1.65
L	Batido 1	146.9	2.937	1.781	1.65	0.65
L	Batido 5	92.0	1.841	1.011	1.82	0.99
L	Batido 6	171.5	3.430	1.739	1.97	1.06
L	Superficie 3	85.9	1.719	0.890	1.93	1.47
	<i>Lb. plantarum</i>	2251.8	45.03	22.46	2.00	2.34
<b>Método alternativo</b>						
C	Leche 1	18774.8	375.49	264.00	1.42	1.85
C	Leche 2	17941.0	358.82	299.56	1.20	1.33
C	Leche 3	15225.4	305.10	340.15	0.90	1.05
C	Leche 5	19389.2	387.78	304.51	1.27	1.56
C	Batido 1	17102.3	342.04	298.41	1.15	1.05
C	Batido 3	13081.9	261.63	223.95	1.17	1.28
C	Batido 4	14160.9	283.21	269.81	1.05	1.06
L	Leche 3	15483.9	309.67	235.58	1.31	1.70
L	Batido 1	15338.1	306.76	202.22	1.52	1.68
L	Batido 5	17498.5	349.97	268.48	1.30	1.26
L	Batido 6	16046.4	320.92	228.82	1.40	1.24
L	Superficie 3	8363.5	167.27	110.69	1.51	1.75
	<i>Lb. plantarum</i>	9094.6	181.89	89.17	2.04	2.32

C: congelado, L: liofilizado.

#### 5.4 Evaluación de integridad del ADN vírico extraído.

Para determinar la integridad del ADN, se realizó la electroforesis en gel de agarosa de las 12 muestras positivas. Las Figuras 9 y 10 son las imágenes obtenidas del gel aplicando luz UV, respectivamente. Como se aprecia en la Figura 9, las señales obtenidas presentan una forma horizontal a lo largo del gel en la mayoría de las muestra de ADN extraído usando el paquete, indicando la fragmentación del ADN. Por otro lado, las muestras extraídas con el método alternativo (Figura 10) presentaron señal en la parte superior del gel indicando una alta integridad. La imagen de la electroforesis del control *Lb. plantarum* se encuentra en la Figura 11, donde se aprecia una ligera señal en la parte superior del gel para las muestras extraídas usando el método alternativo.

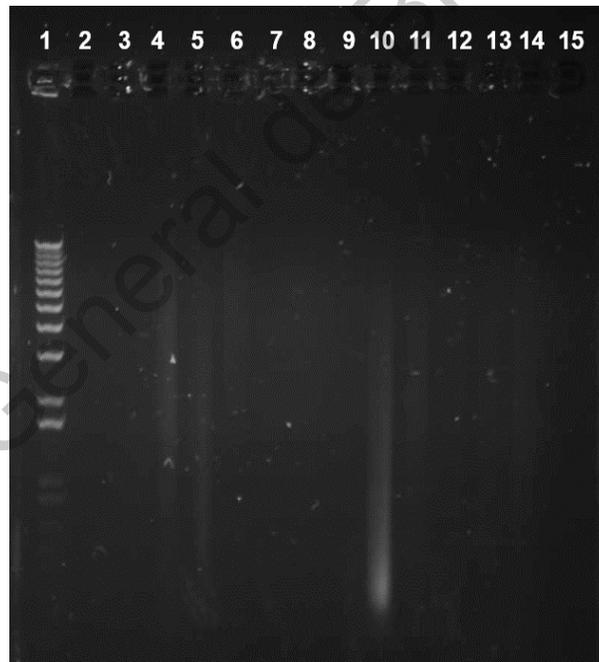


Figura 9. Electroforesis de agarosa con ADN de las 12 muestras positivas y extraído con el paquete. Carril 1: marcador 1 Kb; carril 2: negativo. Muestras con *Lactobacillus* congelado: carril 3: leche 1; carril 4: leche 2; carril 5: leche 3; carril 6: leche 5; carril 7: batido 1; carril 8: batido 3; carril 9: batido 4. Muestras con *Lactobacillus* liofilizado: carril 10: leche 3; carril 11: batido 1; carril 12: batido 5; carril 13: batido 6; carril 14: superficie 3.



Figura 10. Electroforesis de agarosa con ADN de las 12 muestras positivas y extraído con el método alternativo. Carril 1: marcador 1 Kb; carril 2: negativo. Muestras con *Lactobacillus* congelado: carril 3: leche 1; carril 4: leche 2; carril 5: leche 3; carril 6: leche 5; carril 7: batido 1; carril 8: batido 3; carril 9: batido 4. Muestras con *Lactobacillus* liofilizado: carril 10: leche 3; carril 11: batido 1; carril 12: batido 5; carril 13: batido 6; carril 14: superficie 3.

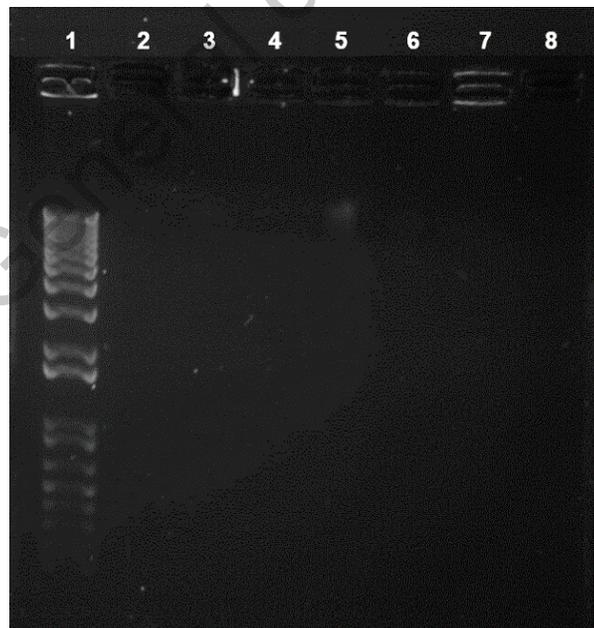


Figura 11. Electroforesis de agarosa con ADN extraído por paquete y método alternativo. Carril 1: marcador 1 Kb; carril 2: negativo; carril 3: ADN de fago ATCC 8014 - B2 extraído con método alternativo; carril 4: ADN de fago ATCC 8014 - B2 extraído con paquete; carril 5: ADN leche 1 extraído con método alternativo; carril 6: ADN leche 1 extraído con paquete; carril 7 y 8: negativo.

A partir de este paso, la experimentación se enfocó en sólo una de las muestras y el control positivo. Se eligió la muestra el ADN de la muestra “leche 1” extraído con el método alternativo debido a su alta integridad, su concentración y sus valores cercanos al objetivo en la relación 260/280 y 260/230.

#### 5.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para el diseño de los pares de oligos, diferentes secuencias de genomas de bacteriófagos que atacan a *Lb. delbrueckii* se compararon en busca de regiones conservadas. Así, los genomas de los bacteriófagos Ld3, Ld17, Ld25A, phiLdb, c5 y P1174 (número de acceso KJ564038.1, KJ564037.1, KJ564036.1, KF188410.1, EU340421.2 y MG913376.1, respectivamente) disponibles en la base de datos se usaron para probar la especificidad de los oligos reportados por Casey y col. (2014). Siendo el par de oligos MHF y MHR correspondiente para Ld3, Ld17, y c5, mientras que el par TAIF y TAIR corresponden a los bacteriófagos Ld17, Ld25A, phiLdb, c5 y P1174. Para el diseño de los oligos del bacteriófago ATCC 8014 - B2 de *Lb. plantarum*, se empleó la secuencia del genoma completo reportada por Briggiler y col. (2012) (número de acceso JX486088.1). Los pares de oligos diseñados no presentaron discordancia con las secuencias comparadas y al ser probados contra todos los bacteriófagos presentes en la base de datos, se encontró su especificidad por las especies objetivo. Por lo cual, el tamaño del amplicón permite identificar a las especies buscadas.

Cada par de oligos se usó por separado en la PCR para el análisis del ADN extraído de la muestra presuntiva con bacteriófagos de *Lb. delbrueckii* o el análisis del control del método. La PCR usando las condiciones propuestas por Zago y col. (2006) no presentó resultados de amplificación con ninguno de los dos pares de oligos disponibles para LBb LA, ni para el fago ATCC 8014 – B2.

#### 5.6 Optimización de condiciones de PCR: gradiente de temperatura.

Un gradiente de temperatura de alineamiento fue establecido considerando la nula amplificación usando las condiciones previamente reportadas por Zago y col. (2006).

El rango del gradiente fue determinado en base a las características de los oligos; temperatura de fusión ( $T_m$  por sus siglas en inglés) y concentración, lo reportado en la literatura y la estimación dada por el calculador de  $T_m$  de Thermo Fisher ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)), siendo establecidas las temperaturas intermedias por el software disponible en el termociclador (Cuadro 6).

Cuadro 6. Condiciones de temperatura de alineamiento empleados en la PCR.

Oligos	$T_m$ (°C)	$T_m$ calc <sup>a</sup> (°C)	Gradiente de temperatura de alineamiento (°C)							
B2F/B2R	54.4/54.9	57.1/57.4	50.0	50.8	52.1	54.0	56.2	58.0	59.3	60.0
TAIF/TAIR	54.9/54.8	57.7/57.6								
MHF/MHR	58.9/58.2	61.2/60.8	55.0	55.8	57.1	59.0	61.2	63.0	64.3	65.0

a: temperatura de fusión calculada con [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com).

El par de oligos B2F/B2R obtuvo un producto aproximado de 1000 pb, en referencia con las bandas del marcador empleado. El amplicón esperado es de 999 pb, por lo que el producto obtenido corresponde a la especie buscada. De las ocho temperaturas probadas, el producto se presentó únicamente bajo las condiciones de 56.2 y 58.0 °C (Figura 12), temperaturas dentro de las cuales se encuentra la  $T_m$  calculada. Con base en esta información, se seleccionó 57 °C como temperatura de alineamiento para este par de oligos.

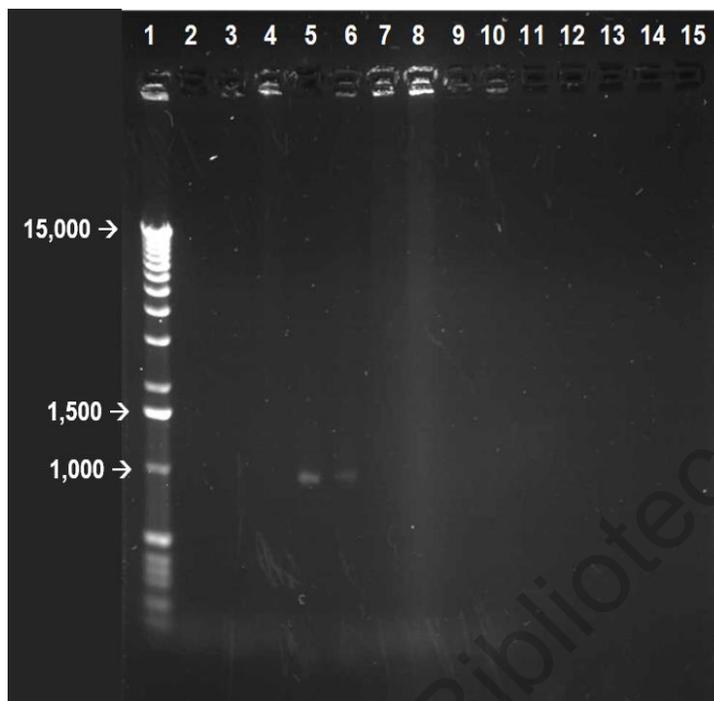


Figura 12. Electroforesis de PCR con gradiente de temperatura (50 - 60 °C) y ADN de fago ATCC 8014 - B2. Carril 1: marcador 1 Kb; carril 2: negativo PCR; carril 3: 60 °C; carril 4: 59.3 °C; carril 5: 58.0 °C; carril 6: 56.2 °C; carril 7: 54.0 °C; carril 8: 52.1 °C; carril 9: 50.8 °C; carril 10: 50.0 °C; carril 11: negativo de electroforesis.

En el caso de los oligos TAIF/TAIR y MHF/MHR, el producto esperado era 899 y 495 pb respectivamente. Al ver el análisis en gel de agarosa, no se observa amplificación bajo alguna de las ocho temperaturas probadas (Figura 13 y 14). A pesar de ello, se seleccionó una temperatura de alineamiento de 56 °C y 60.5 °C para el par TAIF/TAIR y MHF/MHR, respectivamente. Condiciones a las cuales se presentó mayor intensidad en las bandas localizadas en la parte baja del gel. Bajo estas condiciones de alineamiento se trabajó en el gradiente de cloruro de magnesio, con la finalidad de probar si la concentración de dicha sal afectaba el proceso de amplificación.

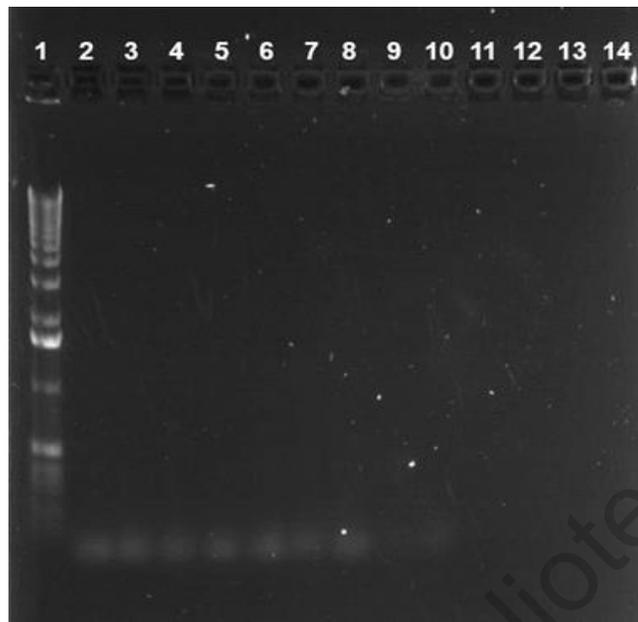


Figura 13. Electroforesis de PCR, gradiente de temperatura (50 - 60 °C) con ADN de fago de *Lb. delbrueckii* y TAIR/TAIF. Carril 1: marcador 1 Kb; carril 2: 60 °C; carril 3: 59.3 °C; carril 4: 58.0 °C; carril 5: 56.2 °C; carril 6: 54.0 °C; carril 7: 52.1 °C; carril 8: 50.8 °C; carril 9: 50.0 °C; carril 10: negativo PCR; carril 11: negativo de electroforesis.

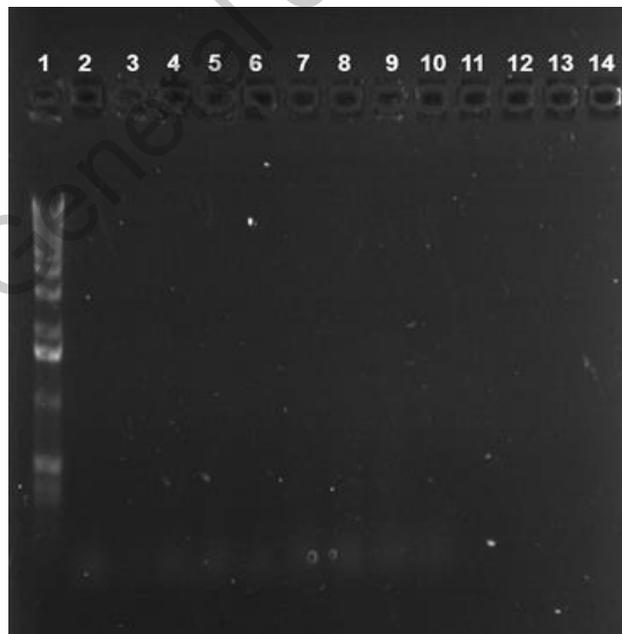


Figura 14. Electroforesis de PCR, gradiente de temperatura (55 - 65 °C) con ADN de fago de *Lb. delbrueckii* y MHF/MHR. Carril 1: marcador 1 Kb; carril 2: 65.0 °C; carril 3: 64.3 °C; carril 4: 63.0 °C; carril 5: 61.2 °C; carril 6: 59.0 °C; carril 7: 57.1 °C; carril 8: 55.8 °C; carril 9: 55.0 °C; carril 10: negativo PCR; carril 11: negativo de electroforesis.

### 5.7 Optimización de condiciones de PCR: gradiente de cloruro de magnesio.

Para mejorar la calidad del producto del ATCC 8014 - B2 amplificado y definir si la concentración de sales afecta la amplificación del fago de *Lb. delbrueckii*, se estableció un gradiente de cloruro de magnesio. El rango del gradiente fue determinado con base a lo reportado en la literatura (Zhang y col., 2006; Ly-Chantain y col., 2011) y pruebas anteriores, abarcando de 4.0 a 8.0 mM.

El rango de cloruro de magnesio donde el producto de ATCC 8014 - B2 obtuvo mejor calidad fue de 4.0 a 5.0 mM, siendo 4.5 mM la condición a la cual el producto presentó mayor intensidad en el gel de agarosa (Figura 15). En el caso del fago de *Lb. delbrueckii*, el gradiente no afectó la actividad del proceso de PCR ya que nuevamente, hubo una nula amplificación del producto esperado (Figura 16 y 17). Sugiriendo que posiblemente los oligos probados no se unen al ADN extraído y por lo tanto, la especie perteneciente del ADN no corresponde a las analizadas durante el diseño de los oligos o que el material genético obtenido pertenece a la bacteria huésped.

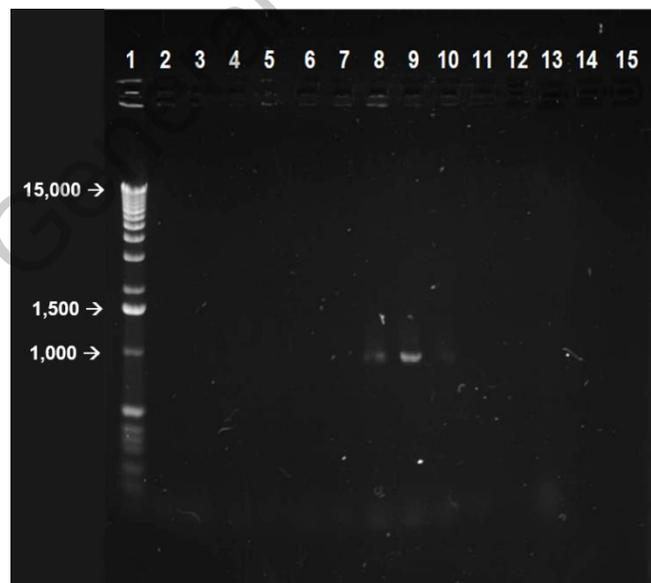


Figura 15. Electroforesis de PCR con gradiente de  $MgCl_2$  (4.0 – 8.0 mM) con ADN de fago ATCC 8014 - B2. Carril 1: marcador 1 Kb; carril 2: 8.0 mM; carril 3: 7.5 mM; carril 4: 7.0 mM; carril 5: 6.5 mM; carril 6: 6.0 mM; carril 7: 5.5 mM; carril 8: 5.0 mM; carril 9: 4.5 mM; carril 10: 4.0 mM; carril 11: negativo PCR; carril 12: negativo de electroforesis.

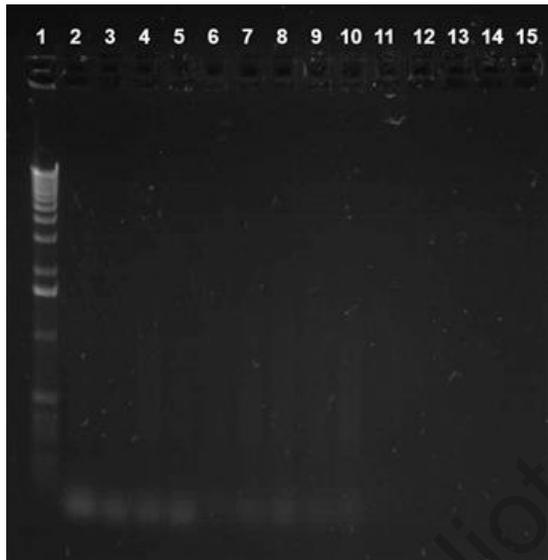


Figura 16. Electroforesis de PCR con gradiente de  $MgCl_2$  (4.0 – 7.5 mM) con ADN de fago de *Lb. delbrueckii* y TAIR/TAIF. Carril 1: marcador 1 Kb; carril 2: 4.0 mM; carril 3: 4.5 mM; carril 4: 5.0 mM; carril 5: 5.5 mM; carril 6: 6.0 mM; carril 7: 6.5 mM; carril 8: 7.0 mM; carril 9: 7.5 mM; carril 10: negativo PCR; carril 11: negativo de electroforesis.

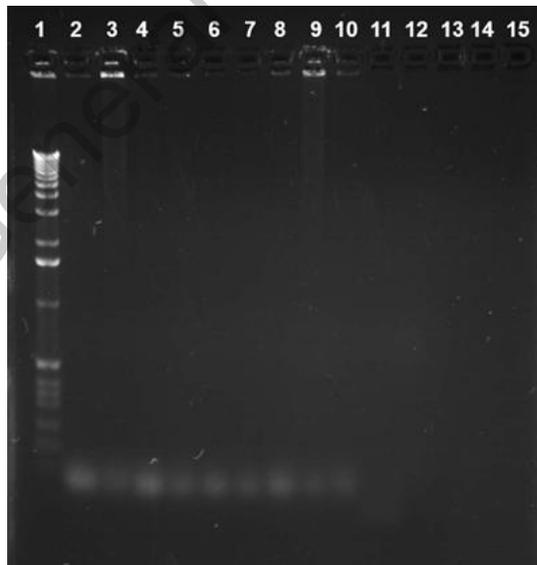


Figura 17. Electroforesis de PCR con gradiente de  $MgCl_2$  (4.0 – 7.5 mM) con ADN de fago de *Lb. delbrueckii* y MHF/MHR. Carril 1: marcador 1 kb; Carril 2: 4.0 mM; Carril 3: 4.5 mM; Carril 4: 5.0 mM; Carril 5: 5.5 mM; Carril 6: 6.0 mM; Carril 7: 6.5 mM; Carril 8: 7.0 mM; Carril 9: 7.5 mM; Carril 10: negativo PCR; Carril 11: negativo de electroforesis.

### 5.8 Determinación de límite de detección.

Para determinar la sensibilidad del método de PCR, una serie de diluciones de ADN de fago ATCC 8014 - B2 fue adicionada a la mezcla de reacción. La menor concentración visible en gel de agarosa fue tomada como el límite de detección, siendo 273 ng/ $\mu$ L la cantidad mínima que se requiere adicionar a la reacción de PCR para dar al menos una señal del producto de amplificación (Figura 18). Esto considerando, la concentración inicial de 9,094.6 ng/ $\mu$ L del material genético extraído de ATCC 8014 - B2.

Es importante señalar que en la máxima concentración probada, la amplificación presentada fue mínima en comparación con concentraciones menores probadas.

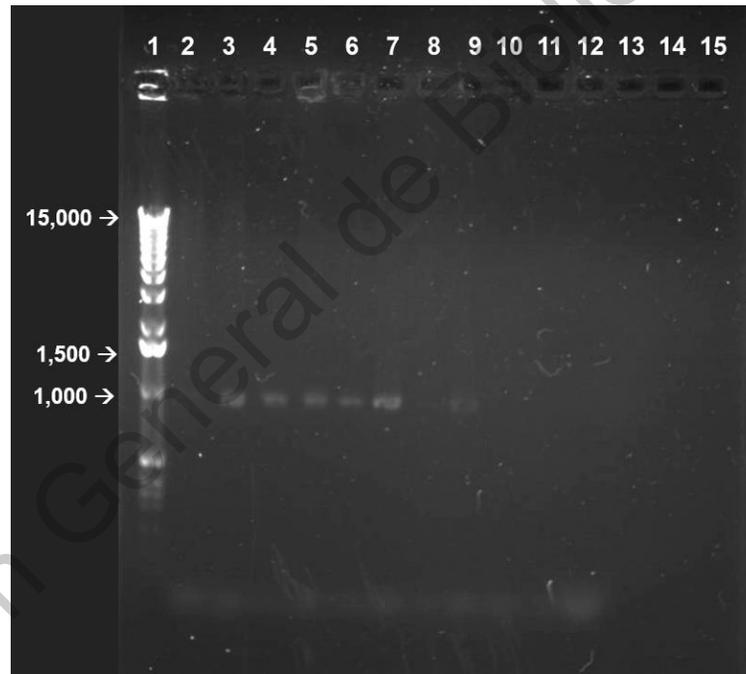


Figura 18. Electroforesis de determinación de límite de detección en PCR con ADN de fago ATCC 8014 - B2. Carril 1: marcador 1 Kb; carril 2: 3.0  $\mu$ L; carril 3: 2.5  $\mu$ L; carril 4: 2.0  $\mu$ L; carril 5: 1.5  $\mu$ L; carril 6: 1.0  $\mu$ L; carril 7: 0.5  $\mu$ L; carril 8: 0.4  $\mu$ L; carril 9: 0.3  $\mu$ L; carril 10: 0.2  $\mu$ L; carril 11: 0.1  $\mu$ L; carril 12: negativo PCR; carril 13: negativo de electroforesis.

## 6. DISCUSIÓN

6.1 Elaboración de curvas de crecimiento de *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* y *Lb. plantarum*.

En las curvas de crecimiento para los microorganismos que fueron utilizados como huéspedes de propagación (Figura 4, 5 y 6) se muestra que los valores de absorbancia van incrementando con el tiempo, hasta llegar a un punto donde los valores se mantienen, siendo 10 horas para *Lb. delbrueckii* y *Lb. plantarum* y 12 horas para *S. thermophilus*. La absorbancia se ve relacionada a la turbidez o densidad óptica del medio, la cual va aumentando conforme se da el desarrollo de la célula hasta llegar a una fase estacionaria donde el crecimiento se detiene lo que causa que la absorbancia se sostenga en los mismos valores (Figura 19).

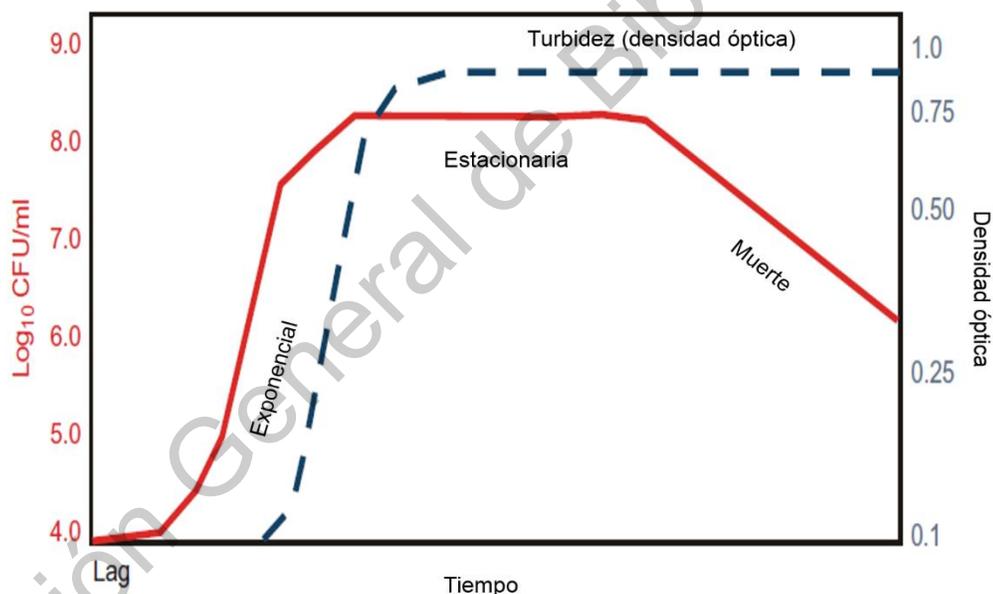


Figura 19. Curva de desarrollo teórica (Rodríguez-Bernal y col., 2014).

Una curva de crecimiento bacteriana se compone de la fase de adaptación (lag), fase exponencial, fase estacionaria y muerte celular. Las bacterias pasan primeramente por una fase de adaptación (lag), en esta fase las bacterias se adaptan fisiológicamente a las condiciones del medio de crecimiento. Durante este periodo el crecimiento es nulo, la adaptación puede requerir un tiempo para la síntesis de

nuevas proteínas o por la baja densidad bacteriana con la que se inicia, lo cual provoca una dilución de los nutrientes en el medio que se escapan fácilmente de las células en crecimiento. La duración de la fase lag depende de las características del medio, tamaño del inóculo inicial y fase en la que se encuentra la bacteria al ser inoculada. Bajo las condiciones utilizadas, la fase lag de *S. thermophilus* y *Lb. plantarum* tuvo una duración aproximada de 4 horas. Por otro lado, la duración de la fase de lag *Lb. delbrueckii* fue tan sólo de 2 horas. La fase lag durará hasta que la población bacteriana alcance aproximadamente  $10^6$  células/mL.

Se obtuvo una tasa de crecimiento de  $0.67$  y  $0.56 \text{ h}^{-1}$  para *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* respectivamente, siendo más lenta para la segunda cepa. De acuerdo con la literatura, se ha reportado una tasa de crecimiento de entre  $0.21$  y  $0.29 \text{ h}^{-1}$  para *S. thermophilus* y un rango de  $0.46$  y  $0.57 \text{ h}^{-1}$  para *Lb. delbrueckii* (Rodríguez-Bernal y col., 2014), a pesar de que el resultado para *Lb. delbrueckii* se encuentra dentro del rango reportado, la tasa de crecimiento de *S. thermophilus* es aproximadamente 3 veces superior a lo reportado. Esta diferencia se asocia a las diferentes condiciones de crecimiento probadas en ambos estudios, ya que el desarrollo de las bacterias depende de la masa media que indica la cantidad de duplicaciones que realiza la bacteria por hora y distribución de la biomasa (Schultz y Kishony, 2013).

Durante la fase exponencial, se presenta un crecimiento de bacterias con mayor rapidez. Aunque el número de células inicial sea bajo, conforme las células se duplican después de cada generación, la cantidad va incrementando drásticamente. Bajo las condiciones utilizadas, todas las bacterias usadas estuvieron en fase exponencial durante aproximadamente 8 horas. Las células dejan esta fase cuando el sustrato comienza a limitarse, disminuyendo su tasa de crecimiento. Después de esta etapa, las células pasan a la fase estacionaria. En esta fase, las células que crecen y se dividen están en equilibrio con la cantidad de células que mueren. Aunque el sustrato es limitante, las células siguen creciendo debido a que las muertas se lisan y son utilizadas como fuente de carbono y energía, este crecimiento resultante a partir de células muertas se conoce como metabolismo endógeno. En las curvas de crecimiento de los 3 microorganismos, la fase estacionaria comenzó

después de 10 horas de incubación. En algunas curvas de crecimiento, como en la de *Lactobacillus plantarum* (Figura 6), se puede observar un ligero desarrollo durante la fase estacionaria mantenido por el metabolismo endógeno al verse limitado el sustrato. Otra razón por la que la fase estacionaria ocurre en cultivos de alta densidad celular es debido a que los productos de desecho formados se acumulan hasta inhibir el crecimiento celular o son tóxicos para las mismas. El crecimiento descrito para ambas cepas usadas, concuerda con lo reportado por Herve-Jimenez y col., (2009) para dichos microorganismos, donde la fase exponencial para *S. thermophilus* inicia después de 2.5 a 3 horas después de ser inoculado en el medio. Mientras que *Lb. delbrueckii* inicia la fase de crecimiento exponencial transcurridas de 3 a 4 horas, ambas cepas alcanzando un desarrollo entre  $10^5$  -  $10^6$  UFC/mL. Esta actividad de crecimiento exponencial continua durante 5 a 6 horas de incubación, para dar paso a la fase de estacionaria (Herve-Jimenez y col. 2009; Rul, 2017). Se ha reportado que tanto *Lb. delbrueckii* como *S. thermophilus* inician su etapa de muerte tras 24 horas de incubación. Aunque este efecto es mostrado en ambas especies, la reducción en concentración de células viables es más severa en la primera cepa, descendiendo aproximadamente 1.5 log tras la primera semana y llegando a reducir hasta 5 log después de 3 semanas en refrigeración (Linares y col. 2016).

A pesar de existir diferencias entre los resultados obtenidos y lo reportado respecto a la duración de cada fase de desarrollo de las cepas, principalmente en la fase exponencial, estas se asocian a las características y condiciones de los medios empleados en cada ensayo. Siendo empleadas en este trabajo aquellas condiciones usadas en ensayos de similares objetivos (Quiberoni y col., 2003; Zhang y col., 2006; Ly-Chantain y col., 2011). Debido a que el objetivo era determinar el tiempo de incubación necesario para que los microorganismos huéspedes lleguen a la fase exponencial, no fue necesario elaborar la curva hasta la última fase. La forma de la curva cambia dependiendo del método por el cual el crecimiento celular sea medido. Por ejemplo, al medir el crecimiento mediante densidad óptica, no es posible diferenciar células vivas y muertas, ni detectar el inicio de la fase de muerte. En la fase de muerte aún puede existir células metabolizando y dividiéndose, pero hay una

tasa mayor muerte de células que las que se obtienen por lo que la cantidad disminuye (Pepper y Gerba, 2015).

## 6.2 Detección de bacteriófagos por método microbiológico.

Para la identificación de la presencia de bacteriófagos, una cantidad de cada muestra (Cuadro 2) fue adicionada a tubos con medio y los huéspedes de propagación. Después del tiempo de incubación para llegar a fase exponencial, se colocó una cantidad del líquido inoculado sobre una capa de agar con concentración 1.5 % p/v y sobre esta se vertió otra capa con una concentración de 0.7 % p/v, este método es conocido como el método de doble capa. Las muestras con bacteriófagos son detectadas debido a que durante la incubación estos virus causan la lisis de las células huéspedes generando zonas claras o translúcidas sobre la superficie de agar, denominadas “zonas de lisis o placas”, y que son generadas por el nulo crecimiento de las bacterias (Figura 7 y 8). Para la formación de la zona de lisis debe haber una adhesión mediada por receptores a nivel membrana de la bacteria. La naturaleza y la ubicación de los receptores de la célula huésped reconocidos por los bacteriófagos varían mucho según el fago y el huésped. Más de un receptor puede estar implicado en el proceso de adsorción, el tipo de receptores en la célula puede variar dependiendo de su morfología. Ambas bacterias utilizadas en este trabajo (*S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii*) son Gram positivas, esto quiere decir que su pared celular está compuesta por una capa gruesa de peptidoglucano. El peptidoglucano es uno de los componentes relacionado a la adsorción de los fagos, este polímero está compuesto de múltiples unidades de aminoácidos y derivados de azúcar. Otro componente relacionado a la adsorción de los fagos es el ácido teicoico, formado por polisacáridos compuestos de fosfato de glicerol o fosfato de ribitol y aminoácidos. Estos polisacáridos se encuentran unidos al ácido murámico de los peptidoglucanos. La adhesión del fago a la célula puede ocurrir cuando se encuentran en el caldo de cultivo, dentro del agar derretido o después de que el agar haya solidificado. Las glicoproteínas que se encuentran en la cápside se agrupan en forma de púas o espinas que son importantes antígenos víricos, éstas se encargan de mediar la unión a los receptores de la célula huésped. Tanto las glicoproteínas como los receptores

determinan la especificidad del hospedador y el virus. Por ejemplo, el fago LL-H de la familia *Siphoviridae* ataca a *Lactobacillus delbrueckii* uniéndose a sus receptores formados por un fragmento de glucosa de los ácidos lipoteicoicos para adsorción reversible y un grupo fosfato de glicerol de los ácidos lipoteicoicos negativamente cargado para unión irreversible. En el caso de *Lactobacillus plantarum*, los fagos B1 y B2 de la familia *Siphoviridae* se unen cada uno a su receptor específico. El fago B1 se une a la galactosa (componente de la pared celular) y el fago B2 a los sustituyentes de glucosa en el ácido teicoico. Los receptores de *S. thermophilus* son sacáridos, siendo la producción y composición de estos exopolisacáridos y polisacáridos capsulares crucial para la interacción del huésped y el fago (Mahony y col., 2016). En consecuencia a su especificidad, los receptores juegan un papel crucial en la resistencia bacteriana al ataque de fagos. La resistencia a la adsorción se puede dividir en tres categorías: bloqueo de receptores de fagos, producción de cápsula o capas de limo, y presencia de inhibidores competitivos. El bloqueo de receptores de fagos se refiere a hacer inaccesible los receptores para fagos vinculando dominios. El segundo mecanismo, se refiere a la inaccesibilidad por la producción de exopolisacáridos que obstruyen el acceso de los fagos a la superficie de la célula. Sin embargo, algunos fagos tienen la capacidad de utilizar estas capas como receptores de adsorción. La presencia de inhibidores competitivos se refiere a la competencia entre moléculas que se unen a los mismos receptores, esto puede ocurrir como parte de la actividad de celular normal durante su metabolismo con la adsorción de sustancias (Bertozzi y col., 2016). Los bacteriófagos específicos para *Lactobacillus delbrueckii* son inactivados por ácidos lipoteicoicos que se encuentran en la pared celular de esta especie microbiana. Sin embargo, el grado de inactivación depende de los residuos D-alanina y L-glucosa disponibles unidos a grupos hidroxilo de los ácidos teicoicos. Un aumento en los niveles de D-alanina favorece la capacidad de inactivación de los fagos por los ácidos lipoteicoicos y su incubación preliminar con lectina conduce a la inhibición completa de la adsorción de fagos (Rakhuba y col., 2010).

El método empleado de doble capa, para el aislamiento de bacteriófagos, depende de la capacidad de la bacteria huésped para formar una capa sobre un medio sólido.

Además de una suficiente cantidad de fagos progenitores para cada célula bacteriana lo que permite que la infección se produzca inyectando su material genético, causando así la posterior lisis de las células huésped (Kropinski y col., 2009). Adicionalmente, los bacteriófagos sintetizan enzimas que hidrolizan al peptidoglicano de la pared celular. Estas enzimas pueden clasificarse en tres grupos principales según el enlace que ataquen en el peptidoglado también conocido como mureína: glucosidasas, amidasas y peptidasas. Las glucosidasas hidrolizan uno de los dos enlaces glucosídicos en la cadena glucano y se pueden subdividir en N-acetil- $\beta$ -d-glucosaminidasas (glucosaminidasas), N-acetil- $\beta$ -d-muramididasas (muramididasas o lisozimas) y transglucosilasas líticas. Las amidasas hidrolizan el enlace amida entre el oligo residuo de aminoácido de la cadena peptídica (generalmente L-alanina), mientras que las peptidasas se encargan de hidrolizar las cadenas peptídicas de los puentes intercatenarios. Las peptidasas se subdividen en carboxipeptidasas, que eliminan los residuos de aminoácidos de C-terminales, y endopeptidasas que hidrolizan los enlaces internos del péptido (Fernández y São-José, 2018).

Además, la interacción entre fago y huésped se ve afectada por factores biológicos como la resistencia bacteriana, y físicos siendo principalmente la temperatura y el pH. La viabilidad de los fagos se encuentra máximo entre 5.0 y 9.0 unidades de pH pero son completamente inactivados a pH de 3.0 y 11.0 (Shende y col., 2017). Se han realizado ensayos donde se comprueba que el método de doble capa mejora la visibilidad de las zonas de inhibición en comparación de otros métodos como el método directo en placa y el método de la gota (Figura 20). Esto es debido a que la capa de agar suave 0.7% permite una difusión más fácil de los bacteriófagos. Para aquellos análisis donde se tenga como objetivo medir el tamaño de la zona de inhibición, se considera que el método de doble agar es el más adecuado (Kropinski y col., 2009). Por otro lado, la variación en la morfología de las zonas lisis puede deberse a la diferencia en la cepa del fago, la fuerza del gel y la adición de cationes (Shende y col., 2017). Los retrasos en el momento de adhesión del fago en la célula huésped resultan en zonas de lisis más pequeñas. Existen tres factores que afectan al momento de adhesión inicial: densidad bacteriana, concentración del agar y la constante de adhesión de fagos. En cuanto mayor es la densidad bacteriana o la

constante de adhesión de fagos cuando antes se dará la infección y por lo tanto, el periodo latente de multiplicación conocido como “eclipse”. Por el contrario, entre mayor sea la concentración del agar, la difusión de los viriones será menor y por lo tanto, la infección y multiplicación se retrasan. Tasas de difusión más altas también se relacionan a un tamaño de partícula de fago más pequeña. Esta variación puede evitarse mediante un paso de pre-adhesión del fago con las bacterias durante varios minutos antes de ponerse en la placa (Kropinski y col., 2009).

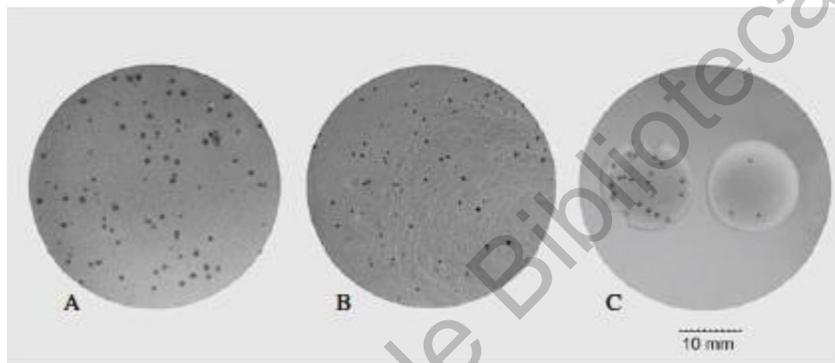


Figura 20. Apariencia de las zonas de inhibición por fagos rV5 con el método del doble agar (A), el método directo en placa (B) y el método de la gota (C); (Kropinski y col., 2009).

*Lb. delbrueckii* y *S. thermophilus* son dos de los microorganismos más utilizados como colonias iniciadoras en la producción de productos fermentados como el yogurt. La leche es el hábitat natural de *S. thermophilus*, pero no de *Lactobacillus*. Numerosas similitudes en las secuencias de proteínas se han encontrado en los fagos de *Lactobacillus* y *Streptococcus*. La similitud en los fagos se ve especialmente marcada en el empaquetamiento del ADN, los genes de la cabeza y la cola, y en algunos casos también en los genes de replicación del ADN (Brüssow, 2001). A pesar de sus similitudes, los bacteriófagos son extremadamente específicos a su bacteria objetivo y raramente afectan otras células. Los fagos se pueden clasificar como virulentos y lisogénicos. Los fagos virulentos sólo se replican por el ciclo lítico causando la lisis de las células y liberando viriones. Los fagos temperados integran sus genomas en el cromosoma de la bacteria y se multiplican en ese estado latente, conocido como profago, a través de múltiples divisiones celulares, hasta que las

condiciones externas como la temperatura o presencia de sales favorecen el ciclo lítico (Pujato y col., 2018).

Los resultados obtenidos por el método de doble capa se encuentran en el Cuadro 4, la mitad de las muestras mostraron zonas de lisis con al menos uno de los huéspedes, indicando la presencia de bacteriófagos. Los bacteriófagos de todas las muestras positivas lisaron a *L. delbrueckii*, siendo dos de ellas positivas utilizando *L. delbrueckii* y *S. thermophilus*. Debido a sus similitudes, los fagos que atacan a *L. delbrueckii* y *S. thermophilus* pueden ser pertenecientes a la familia *Myoviridae* o *Siphoviridae* (Fox y col., 2017). Sin embargo, Mahon y col., (2016) mencionan que los fagos que atacan a *Lactobacillus* no pueden ser clasificados en sólo una familia debido a la gran diversidad genética de esta especie. Se sugiere que estos fagos se clasifiquen según su rango de huéspedes (los diferentes géneros, especies y cepas de bacterias que puede lisar), morfología y por relación genética a nivel intraespecie. Mientras que la familia de fagos *Siphoviridae* se relaciona más *S. thermophilus*.

En general, las clonas de *Lb. delbrueckii* presentaron una incidencia mayor de lisis, siendo un total de 11 muestras positivas que representan un 55 % de las muestras probadas. Por otra parte, las clonas de *S. thermophilus* presentaron lisis con 2 de las 20 muestras usadas en los ensayos, lo que representa sólo un 10 % de las muestras probadas. En el Cuadro 4 se puede observar que los resultados positivos para *Lb. delbrueckii* fueron obtenidos utilizando mayormente muestras de leche y batido, mientras que en superficies de trabajo solo una de las muestras presentó lisis de la cepa huésped. Resultados negativos fueron obtenidos al utilizar muestras de yogurt, agua de lavado y en la mayoría de las muestras recolectadas en superficies. Esto se relaciona con lo reportado sobre los fagos que atacan a *Lb. delbrueckii*, los cuales presentan gran resistencia a la pasteurización, pero son altamente sensibles al pH (del Rio y col., 2007). Coincidiendo con la presencia de fagos observada en la leche cruda y en los batidos, demostrando ser la leche cruda ser una de sus fuentes principales de origen y su resistencia térmica en las últimas muestras donde el proceso de pasteurización ya ha sido aplicado. Por el contrario, las muestras de yogurt al tener un bajo pH presentan un ambiente poco adecuado para la supervivencia de los fagos, dando una ausencia de ellos tras su análisis

microbiológico. La mayor incidencia de fagos que afectan a *Lb. delbrueckii* en los productos lácteos analizados difiere a lo reportado por Briggiler y col., (2019) y del Rio y col., (2007), donde se menciona que el número de infecciones de fagos a esta especie es menor que las que afectan a *S. thermophilus*. Sin embargo, la baja incidencia de infección en *S. thermophilus* ha sido reportada anteriormente y en los últimos años los reportes de esta interacción han incrementado (McDonnell y col. 2016). Los fagos pueden venir de varias fuentes. A pesar de esto, la leche y sus derivados han sido documentados como las principales fuentes de estos. Siendo la leche el principal acarreador de bacteriófagos. Los fagos son ubicuos en el medio ambiente, la biosfera terrestre contiene más de 1031 tipos de bacteriófagos, se han aislado de diversas fuentes como las heces humanas, heces de animales, comida, tierra, y alcantarillado. Se ha encontrado que la presencia de bacteriófagos es más frecuente en ciertos alimentos como la leche, pollo y animales de mar que en muestras ambientales y vegetales. Los bacteriófagos han desarrollado clases específicas de proteínas tales como adhesinas y lisinas para mediar en el reconocimiento específico del huésped bacteriano y la lisis rápida y eficiente después de la infección (Jurczak y col., 2016).

La facilidad con la que los fagos provenientes de la leche atacan al cultivo láctico utilizado para la fermentación dependerá de la cepa utilizada y su proporción (generalmente se usa una combinación de *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* o *Lactococcus lactis*), además del estado en que se agregue la cepa (liofilizada o congelada). Shao y col., (2017) reportan un número mayor de células viables al usar *Lb. delbrueckii* liofilizada aunque esto puede variar al utilizar la cepa congelada asegurando mantener su cadena de frío. Además de algunos factores ambientales como el pH, temperatura y presencia o ausencia de iones divalentes influyen en el nivel de reconocimiento de los fagos de la superficie de las células (Mercanti y col., 2015). Se sabe que los bacteriófagos pueden coexistir con los posibles huéspedes en un mismo sitio. Sin embargo, se precisa que estos reconozcan receptores particulares en la superficie celular para desencadenar el proceso de infección. Estos receptores se encuentran en la membrana externa que funciona como una barrera lipídica adicional que rodea la pared celular y que juntas se conocen como

periplasma. La parte interna de la capa externa está compuesta de fosfolípidos y la parte externa de glucolípidos, particularmente lipopolisacáridos. Las moléculas de polisacáridos están compuestas de tres partes: la sección lipídica (lípidos A), un oligosacárido “núcleo” no repetitivo y el polisacárido del antígeno O altamente variable. El antígeno O es uno de los principales antígenos que se encuentra en la superficie de las células, contribuyen a la diferenciación de serotipos en bacterias Gram negativas y funciona como receptor de fagos que infectan este tipo de células huésped. Esta pared externa también está formada por proteínas (como lipoproteínas), entre ellas se encuentran las proteínas de unión-receptor, las cuales ayudan a efectuar la absorción de los fagos en las células huésped ya que favorecen la interacción con los receptores. El mecanismo por el cual los fagos inyectan su material genético puede dividirse en dos pasos: la búsqueda y unión (absorción) de los receptores de la envoltura de la pared celular con el fago, la perforación controlada de esta capa y la inyección del ADN viral en el citoplasma de la célula huésped. Tras las interacciones apropiadas de fago/receptor, el virón unido sufre importantes reordenamientos estructurales. Esto sucede porque los viriones libres almacenan energía en un estado metaestable y la interacción con los receptores bacterianos en condiciones adecuadas desencadena la transición a una configuración estructural de menor energía. Esta transición es crucial para abrir el conector de la cabeza a la cola del bacteriófago para la salida del ADN y permitir que la cola forme un conducto a través de la pared celular para adicionar su genoma viral hacia las células huésped (Fernandes y São-José, 2018). La composición de la pared celular de las BAL presenta principalmente proteínas, carbohidratos (exopolisacáridos), ácido teicoico y ácidos lipoteicoicos que pueden definir la interacción con un determinado bacteriófago. Debido a esto, la mayoría de los bacteriófagos que infectan bacterias ácido lácticas (BAL) tienen un rango limitado de huéspedes debido a su especificidad (Mahony y col. 2016).

Es importante señalar, que los títulos de bacteriófagos obtenidos de los ensayos de doble placa estuvieron entre  $10^1 - 10^3$  UFP/mL. Lo que puede señalar una baja concentración inicial en las muestras analizadas. Las concentraciones obtenidas se encuentran por debajo de los datos reportados en otros estudios. Los niveles usuales

alcanzados después de la fase de propagación se encuentran entre  $10^7$  y  $10^9$  UFP/mL (McDonnell y col. 2016; Fox y col. 2017). Otros autores reportan que la mayoría de los lisados contienen entre  $10^6$  y  $10^{11}$  UFP/mL, además de que se considera que diluciones de  $10^{-5}$  y  $10^{-9}$  son suficientes para ver zonas de lisis en las placas (Kropinski y col., 2009). Para que la presencia de bacteriófagos se considere como una amenaza al proceso de fermentación, se requiere de al menos una concentración inicial de  $10^5$  UFP/mL presentes ya sea en la leche o su suero (del Rio y col., 2007). Debido a que el título máximo obtenido durante los ensayos fue de  $10^3$  UFP/mL, la presencia de fagos no se considera una amenaza primordial a la etapa de fermentación.

A pesar de que los ciclos de replicación de bacteriófagos tardan de 45 – 60 min y se producen entre 2 -105 nuevas partículas virales, las diferencias en la tasa de crecimiento depende de la tasa de crecimiento del huésped, la especificidad y concentración del bacteriófago; las condiciones del medio como la presencia de sales (particularmente iones divalentes), compuestos orgánicos, agitación y temperatura; tamaño de las células, la densidad de los receptores en la superficie de las mismas, mecanismos de resistencia celular y la actividad enzimática (Fox y col., 2017). Además, la concentración de fagos se relaciona con el estado en que se utilice el medio de difusión, ya sea como caldo o agar sólido. El estado físico del medio se relaciona con el grado en que limitan la difusión y la motilidad de los fagos. El caldo se considera el estado ideal para el desarrollo, por otro lado, el agar sólido impone restricciones significativas sobre el movimiento de los fagos y bacterias afectando la interacción que pudieran tener. El tiempo que el fago pasa infectando o interactuando con las bacterias es otro factor que afecta directamente al tamaño de la lisis. Se ha observado que varios fagos infectan a las células huésped a cierta velocidad constante durante la formación estas zonas, aunque no se alcanza durante las primeras horas de la incubación (Kropinski y col., 2009).

La identificación rápida de bacteriófagos es un factor determinante en la producción de productos lácteos fermentados como el yogurt, ya que la infección por bacteriófagos causa lisis en las colonias iniciadoras. Lo que causa la interrupción de la fermentación de la azúcar de la leche a ácido láctico, afectando por la tanto a la

disminución de pH lo que provoca cambios organolépticos. Además del retraso en la fermentación, los fagos pueden causar alteraciones en la calidad del producto e incluso pérdida del mismo. Actualmente, se han empleado tecnologías de modificación del ADN de las principales BAL empleadas en la fabricación de productos lácteos fermentados, con el fin de generar una resistencia o inmunidad a bacteriófagos.

### 6.3 Cuantificación del ADN vírico extraído del sobrenadante clarificado de bacteriófagos.

Para facilitar la visualización del ADN en la electroforesis de gel de agarosa y para su posterior amplificación mediante PCR, una concentración alta de ADN es deseable. Un valor cercano a 1.8 en la relación de 260/280 indica un ADN puro. Por otro lado, un valor cercano a 2.0 - 2.2 para la relación 260/230, indica una buena pureza de los ácidos nucleicos. Los valores de absorbancia a 260 nm, 280 nm y en ocasiones a 230 nm se utilizan para calcular índices de pureza de los ácidos nucleicos medidos. En el Cuadro 5 se encuentran los valores de concentración de ADN, la relación 260/280 y 260/230, obtenidos para las muestras que formaron zonas de inhibición en el método microbiológico. Para este paso, el ADN de los fagos de las muestras positivas fue extraído utilizando el paquete de aislamiento por afinidad de ADN de bacteriófagos Norgen y el método alternativo propuesto. El primer aspecto destacable en los resultados es que el método alternativo permite obtener una concentración de ADN más alta que utilizando el paquete de extracción. Sin embargo, se obtuvo un ADN más puro utilizando el paquete ya que la mitad de las muestras tienen una relación 260/280 cercana a 1.8, ninguna de las muestras de ADN obtenidas por el método alternativo tiene un valor cercano al deseado. En cuanto a la pureza de los ácidos nucleicos, los únicos valores cercanos en la relación 260/230 a 2.0 - 2.2 son los obtenidos para el ADN del control *Lb. plantarum* extraído tanto con el paquete y el método alternativo, y para el ADN de la muestra de la leche 1 extraído con el método alternativo. Un valor mayor de 1.8 en la relación 260/280 indica que probablemente el ADN está contaminado con RNA; un valor menor a 1.8 en la relación 260/280 indica contaminación con polisacáridos, fenol u otros reactivos

usados en la purificación y está directamente relacionada con la pobre calidad del ADN. Los índices de pureza son sensibles a la presencia de contaminantes en la muestra, como los solventes y reactivos residuales que se utilizan normalmente en la purificación de la muestra. Aunque los índices de pureza son indicadores importantes de la calidad de la muestra, el mejor indicador de calidad es la funcionalidad de la aplicación de recuperación y purificación de interés. El ADN del fago es purificado de otros componentes celulares sin el uso de cloroformo o fenol como en el método alternativo. El hecho de no utilizar estos solventes para la extracción del ADN es la razón por la que se obtienen valores más altos de pureza del ADN utilizando el paquete. Inicialmente, las células bacterianas son lisadas a través de calor y el amortiguador de lisis (proveído en el paquete). Posteriormente, isopropanol es añadido al lisado, y la solución se coloca dentro de una columna de sílica. Los ácidos nucleicos se unen dependiendo de sus concentraciones iónicas, debido a esto sólo el ADN se unirá a la columna mientras que la mayoría del ARN y las proteínas se eliminan en el líquido filtrado. El ADN unido se lava posteriormente con una solución de lavado provista en el paquete para que elimine las impurezas restantes, y el ADN total purificado se eluye en el tampón de elución también proveído en el paquete (Norgen Biotek Corp, 2014). El método alternativo usa enzimas RNasa para eliminar cualquier ADN y ARN bacteriano residual en el lisado, la centrifugación posterior permite eliminar los residuos celulares. Posteriormente, EDTA es añadido para inactivar la RNasa, el SDS es añadido para alterar las membranas celulares, al ser un agente disruptivo que rompe la interacción de los ácidos grasos y lípidos de membrana. El amortiguador Tris ayuda a la precipitación de los fagos ya que neutraliza las cargas negativas de la molécula de ADN y mantienen el pH en un punto estable, generalmente 8.0, así las moléculas de ADN permanecen íntegras durante el proceso de lisis. La adición de cloroformo:isoamil alcohol se utiliza para purificar el ADN. Los contaminantes se desnaturalizan y se acumulan en la fase orgánica o en la capa entre las dos fases y los ácidos nucleicos se conservan en la fase acuosa o fase superior. Las sales y alcohol restantes son removidos lavando con etanol. Posteriormente, el sedimento de ácidos nucleicos se resuspende en agua grado molecular (Jakociuné y Moodley, 2018). Con base a los

resultados obtenidos, se comprueba que la concentración y pureza del ADN obtenido dependerá del método utilizado siendo que el método alternativo ayuda a obtener una concentración alta de ADN lo que favorecerá su visualización en la electroforesis. Se considera que un título de  $10^6$  UFP/mL resulta en una pobre recuperación de fagos con el método alternativo y un título entre  $10^8$  -  $10^{10}$  UFP/mL se considera ideal (Brown y col., 1994). Para el paquete, se considera ideal un título entre  $10^6$  -  $10^{10}$  UFP/mL (Norgen Biotek Corp, 2014).

Las muestras analizadas tuvieron títulos entre  $10^1$  -  $10^3$  UFP/mL, por lo que se sugiere que concentraciones de ADN vírico más altas pudieron haber sido obtenidas si se hubiera tenido una concentración de fagos inicial más alta. Fox y col., (2017) mencionan que cepas de *St. thermophilus* y *L. delbrueckii* poseen un sistemas de restricción/modificación (R/M) para evitar la infección de bacteriófagos, donde el ADN del virus es degradado por una endonucleasa de restricción específica del sitio y el ADN del huésped es metilado por una metilasa análoga. A pesar de que este sistema puede ser evitado por el bacteriófago, combinado con otros mecanismos de defensa suelen ser eficaces. Otros factores que afectan la concentración del ADN vírico son la tasa de crecimiento del huésped, la especificidad y concentración en que se encuentre el bacteriófago; las condiciones del medio como la presencia de iones divalentes, temperatura, pH; tamaño de las células y la densidad de los receptores en la superficie de las mismas. Además, algunos profagos tienen sistemas específicos para detener su energía celular cuando es atacada por fagos con ciclo lítico, lo que provoca la muerte de la célula, pero protege a las otras células huéspedes de ser infectadas (Casey y col., 2014).

#### 6.4 Evaluación de integridad del ADN vírico extraído.

Para determinar la integridad del ADN, se realizó la electroforesis en gel de agarosa de las 12 muestras positivas extraídas con el paquete y el método alternativo. Las imágenes obtenidas aplicando luz UV se encuentran en las Figuras 9 y 10. La integridad es un parámetro que describe la distribución de tamaños de ADN fragmentado, se refiere al estado de degradación en que se encuentra el ADN (Didelot y col., 2013). La electroforesis en gel de agarosa es la forma más efectiva

de separar fragmentos de ADN en diferentes tamaños dependiendo del marcador utilizado. Para este experimento se utilizó un marcador de 1 Kb, este marcador consiste de 18 fragmentos de ADN purificados por cromatografía individual que varían desde 100 bp a 15,000 bp (Figura 21) (ThermoFisher Scientific, 2017). La agarosa es extraída de algas del género *Gelidium* y *Gracilaria*, consiste en subunidades repetidas de agarobiosas (disacáridos compuestos de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa). En la electroforesis, la agarosa se utiliza para la formación de un gel al cual se le aplica un campo eléctrico. El fosfato que forma parte de los nucleótidos que constituyen el ADN está cargado negativamente, por lo tanto, al aplicar un campo eléctrico, los fragmentos de ADN migrarán al ánodo cargado positivamente. Debido a que las moléculas de ADN tienen una relación masa/carga uniforme, pueden ser separadas por tamaños dentro de un gel de agarosa en donde la distancia que recorren es inversamente proporcional a su peso molecular. La velocidad de migración de las moléculas de ADN a través del gel está determinada por su tamaño, concentración de agarosa, conformación de ADN, voltaje aplicado, presencia de bromuro de etidio, tipo de agarosa y tampón de electroforesis. La integridad del ADN debe ser suficiente para su posterior amplificación (Lee y col., 2012). En la Figura 9, se puede observar la presencia de una señal horizontal a lo largo del gel en la mayoría de las muestras de ADN extraído con el paquete, esto asociado a la presencia de fragmentos más pequeños indicando que el ADN está degradado. Por otro lado, las muestras extraídas con el método alternativo (Figura 10) presentaron señal en la parte superior del gel indicando una alta integridad. Una alta integridad de ADN de bacteriófagos usando este método ha sido reportado por Jakociuné y Moodley, (2018).

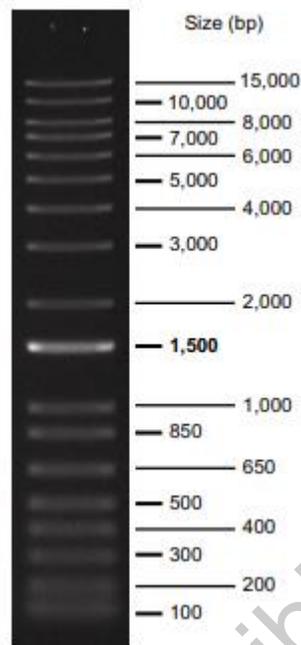


Figura 21. Marcador de 1 Kb de Invitrogen (ThermoFisher Scientific, 2017)

A pesar de que el método alternativo permite obtener una concentración de ADN mayor con una mejor integridad, se debe de considerar que la cantidad de muestra necesaria para este es 49 veces mayor a la cantidad necesaria para extraer el ADN con el paquete Norgen.

Para la siguiente parte, el diseño de oligos y amplificación por PCR, se trabajó con sólo una muestra y el control del método. Con base a los datos anteriores, se seleccionó la muestra “leche 1” debido a su alta concentración de ADN obtenida por el método alternativo, su índice de pureza más cercanos al objetivo y principalmente la integridad del ADN presentada en la electroforesis.

#### 5.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La identificación del control positivo utilizando el ADN del fago ATCC 8014 - B2 con *Lb. plantarum* extraído con el método alternativo fue posible utilizando el par de oligos B2F/B2R, cuyo amplicón esperado era 999 pb. La banda fue localizada en un producto aproximado de 1000 pb utilizando la temperatura de 57 °C seleccionada con base a un gradiente de temperatura, cuya amplificación se presentó únicamente

bajo las condiciones de 56.2 y 58.0 °C (Figura 12). El rango del gradiente de temperatura fue seleccionado con base a las características de los oligos, T<sub>m</sub> y concentración, lo reportado en la literatura (Zhang y col., 2006; Del Rio y col., 2007; Ly-Chantain y col., 2011; Cornelissen y col., 2016) y la estimación dada por el calculador de T<sub>m</sub> de Thermo Fisher ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)), las temperaturas intermedias fueron establecidas por el software disponible en el termociclador. El rango del gradiente de MgCl<sub>2</sub> fue determinado con base a lo reportado en la literatura (Zhang y col., 2006; Ly-Chantain y col., 2011) y pruebas anteriores, abarcando un rango de 4.0 a 8.0 mM. Se decidió utilizar la concentración de 4.5 mM debido a que fue la condición que presentó mayor intensidad en el gel de agarosa (Figura 15). Las condiciones usadas antes de la elaboración de los gradientes de temperatura y cloruro de magnesio propuestas por Zago y col., (2006) no amplificaron al ADN del fago ATCC 8014 - B2. Por otro lado, para los oligos TAIF/TAIR y MHF/MHR se esperaba un producto de 899 y 496 pb, respectivamente. Sin embargo, no hubo amplificación con ninguna de las 8 temperaturas probadas pero se seleccionó la temperatura de alineamiento con mayor intensidad de las bandas localizadas en la parte baja del gel, las cuales fueron de 56 °C y 60.5 °C para el par TAIF/TAIR y MHF/MHR, respectivamente. El gradiente de cloruro de magnesio no afectó el resultado obtenido ya que nuevamente hubo nula amplificación con ambos oligos. Debe de considerarse que con ambos oligos sólo 6 especies de bacteriófagos pueden ser identificadas. Actualmente se reportan 231 fagos para el género *Lactobacillus* pero sólo 136 de ellos han sido caracterizados morfológicamente (Briggiler y col., 2012). Debido a la diversidad de fagos que pueden atacar a las células de *Lb. delbrueckii* se sugiere que posiblemente los oligos probados no se unen al ADN extraído y por lo tanto, la especie perteneciente del ADN no corresponde a las analizadas durante el diseño de los oligos.

Para que una PCR sea exitosa existen algunos parámetros que deben ser cuidados, como el templado de ADN, la ADN polimerasa, los oligos, los desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP), el cofactor requerido (Mg<sup>+2</sup>) y el amortiguador. El templado de ADN puede ser obtenido a partir de ADN genómico (gADN), DNA complementario

(cADN) y ADN plasmídico. La composición del ADN afectará directamente a la cantidad óptima requerida para la amplificación de PCR. En el caso del ADN plasmídico la cantidad inicial de 0.1 a 1 ng puede ser suficiente para la amplificación de una reacción de 50  $\mu$ L, mientras que la cantidad de ADN genómico necesaria para la misma reacción estaría entre 5 - 50 ng. Para determinar el límite de detección, es decir, la mínima cantidad de DNA necesario para obtener una banda más o menos visible en el gel de agarosa, se hizo una electroforesis utilizando diferentes concentraciones del ADN control *Lb. plantarum*. Se colocaron 7 diluciones del ADN extraído de ATCC 8014 - B2 con  $10^8$  de título. Las diluciones utilizadas fueron desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$ . La menor concentración visible en gel de agarosa fue tomada como el límite de detección, siendo 273 ng/ $\mu$ L la cantidad mínima que se requiere adicionar a la reacción de PCR para dar al menos una señal del producto de amplificación (Figura 18). Esto considerando, la concentración inicial de 9,094.6 ng/ $\mu$ L del material genético extraído de ATCC 8014 - B2. Las concentraciones de ADN utilizados para la amplificación fueron mayores al límite de detección. Es importante destacar que en la máxima concentración probada no se presentó amplificación. Optimizar la cantidad de ADN necesaria para su la amplificación es importante ya que cantidades muy altas aumentan el riesgo de amplificación inespecífica, mientras que las cantidades más bajas reducen los rendimientos. La cantidad óptima de ADN necesaria para la amplificación también depende de la DNA polimerasa utilizada ya que su sensibilidad depende de la afinidad que tenga con el templado de ADN. Además, la ADN polimerasa seleccionada debe estar certificada para un nivel bajo de ADN residual, para minimizar las señales falsas en la PCR. La Taq ADN polimerasa es la enzima comúnmente más usada para la amplificación, tiene una termoestabilidad relativamente alta, con una vida media de aproximadamente 40 minutos a 95 °C. Es capaz de incorporar nucleótidos a una velocidad de aproximadamente 60 bases por segundo a 70 °C y puede amplificar longitudes de aproximadamente 5 Kb, debido a esto, es adecuada para una PCR estándar sin requisitos especiales. En una reacción de 50  $\mu$ L, 1 – 2 unidades de ADN polimerasa son suficientes para la amplificación del ADN objetivo. Sin embargo, puede ser necesario ajustar las cantidades de enzima y oligos con templados difíciles aunque

debe de considerarse que una mayor cantidad de productos de PCR no específicos pueden ser generados. Los oligos son oligonucleótidos sintéticos de ADN de aproximadamente 15 a 30 pb, éstos son diseñados para unir secuencias por complementariedad desde el extremo 3' con apoyo de la ADN polimerasa. Por lo tanto, el diseño del oligo es un paso muy importante ya que su homología debe ser mínima con otras secuencias del ADN para garantizar la amplificación del objetivo deseado. Las secuencias de oligos deben poseer temperaturas de fusión ( $T_m$ ) en el rango de 55 – 70 °C, con las  $T_m$ s de los dos cebadores dentro de los 5 °C entre sí. Igualmente, importante, los cebadores deben diseñarse sin complementariedad entre los cebadores (especialmente en sus extremos 3') que promuevan su unión (es decir, cebadores-cebadores), y cause autocomplementariedad o autocebado, creando repeticiones directas que crean una alineación imperfecta con el objetivo. Se recomienda que el oligo tenga una cantidad de guanina-citosina entre 40 y 60 % distribuidos uniformemente para evitar un mal ajuste. Aunque la presencia de un nucleótido G o C en el extremo 3' puede ser beneficioso la amplificación, no se recomienda que más de 3 bases de G o C estén en el extremo 3'. Los oligos son añadidos a la reacción en un rango de 0.1 a 1  $\mu$ M. Los oligos diseñados para las muestras y el usado para el control en este trabajo cumplen con las características de  $T_m$  y presencia de guanina-citosina mencionadas. El ion magnesio ( $Mg^{+2}$ ) funciona como un cofactor para la actividad de la ADN polimerasa que permite la incorporación de la dNTP durante la polimerización. La presencia de iones de magnesio en el sitio activo de la enzima ADN polimerasa cataliza la formalización de enlaces fosfodiéster entre el 3' -OH de un oligo y el grupo fosfato de un dNTP. Además, los iones  $Mg^{+2}$  facilitan la unión entre los oligos y los templados de ADN debido a estabilizan las cargas negativas de sus grupos fosfatos. Generalmente, se usa una concentración final de  $Mg^{+2}$  en el rango de 1 a 4 mM, con incrementos de 0.5 mM recomendados para la optimización. Una concentración muy alta puede provocar el origen de productos no específicos debido en parte a la incorrecta incorporación del dNTP. Los desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP's) consisten en 4 nucleótidos básicos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) que ayudan a la formación de las nuevas cadenas de ADN. La recomendación final para cada dNTP es generalmente

de 0.2 mM, aunque en algunos casos una concentración mayor puede ayudar especialmente con niveles altos de  $Mg^{+2}$  ya que suele unirse a las dNTP's y reduce su disponibilidad para su incorporación. Sin embargo, una concentración excesiva de dNTP puede inhibir la reacción. La concentración a la que se encuentren no debe ser menor a 0.010 - 0.015 mM (su  $K_m$  estimada). El amortiguador crea el ambiente químico ideal para la actividad de la DNA polimerasa. El amortiguador óptimo para ser usado depende de la ADN polimerasa usada. Usualmente el buffer tiene un pH entre 8.0 y 9.5 (ThermoFisher, 2016).

Aunque hubo nula amplificación del ADN de la muestra leche 1 utilizando ambos pares de oligos, se demuestra la efectividad del método alternativo para extraer ADN vírico de fagos utilizando el control *Lb. plantarum* con el fago ATCC 8014 - B2. Resultados positivos para la identificación de fagos utilizando este método para extraer ADN vírico fueron reportados también por Brown y col., (1994) y Zago y col., (2006).

## 7. CONCLUSIONES

El uso de bacterias ácido lácticas (BAL) en la industria de productos lácteos fermentados, como el yogurt, es de vital importancia para el procesamiento y elaboración de dichos productos. Siendo *Lb. delbrueckii* y *S. thermophilus* dos de los microorganismos más empleados. Al ser los protagonistas del proceso de fermentación láctea, se requiere de su viabilidad para tener un producto de características físicas y sensoriales deseadas. Por ello, la detección y monitoreo de bacteriófagos en plantas procesadoras de lácteos fermentados es vital, ya que son una de las principales causas que afectan la etapa de fermentación.

La planta productora posee una baja incidencia de bacteriófagos que ataquen a las dos cepas huésped empleadas para la elaboración de yogurt (*Lb. delbrueckii* y *S. thermophilus*). Siendo la leche cruda la principal fuente de ingreso al proceso de producción y *Lb. delbrueckii* la cepa más sensible a la infección por fagos. A través de método microbiológico se encontró que algunas variedades de bacteriófagos son capaces de resistir el proceso térmico de pasteurización, ya que en muestras correspondientes a la etapa de batido, presentaron lisis sobre *Lb. delbrueckii*. Sin embargo, la sensibilidad a la disminución de pH se hizo presente en las muestras de yogurt, como producto final, ya que no se detectó actividad alguna de bacteriófagos. A pesar de la identificación de lisis en las muestras, se presentaron títulos máximos de  $10^3$  ufp/mL, indicando una baja concentración inicial de bacteriófagos presentes.

El desarrollo de *Lb. delbrueckii* y *S. thermophilus* presenta diferencias, por lo que las curvas de crecimiento permitieron conocer la cinética de desarrollo y su manejo posterior.

El presente estudio evidenció las diferencias entre una extracción de ADN usando solventes y enzimas y una extracción empleando un paquete comercial de aislamiento por columna de afinidad (Norgen Phage isolation kit, Biotek. Cat 46800). Siendo la principal diferencia, el volumen empleado de muestra en cada procedimiento, ya que el primer método usa 49 veces más volumen de muestra que

el método de extracción por paquete. Dicha diferencia, afecta directamente a la cantidad de material genético obtenido, siendo mayor en la extracción con solventes. Otra diferencia considerable, es la calidad del ADN obtenido. El paquete permite obtener mayor calidad en menor cantidad, mientras que el otro método da mayor cantidad con una menor calidad. Al obtener similar integridad en ambos procesos de extracción, se concluyó que la concentración de ADN es un factor determinante para proseguir su uso en la reacción de PCR.

Tras la aplicación de la metodología de PCR, no fue posible la amplificación del ADN vírico obtenido de las muestras. Sugiriendo que los oligos probados no se unen al ADN extraído y por lo tanto, la especie de fago perteneciente del ADN no corresponde a las analizadas durante el ensayo de especificidad de los oligos. Sin embargo, se logró el desarrollo de una metodología para la identificación de bacteriófagos usando la muestra control, fago ATCC 8014 - B2. Demostrando la eficiencia y sensibilidad de la aplicación de ensayos de PCR para la detección de bacteriófagos. Así como, la reducción de tiempo empleado en comparación con los métodos microbiológicos que tardan días.

Finalmente, el presente estudio demuestra las buenas prácticas de manufactura y limpieza empleadas en la planta procesadora, la eficiencia del monitoreo del proceso y la aplicación de metodologías para evitar una infección por virus en gran escala. El monitoreo de bacteriófagos durante el proceso de producción es importante para identificar los puntos donde se puede presentar una mayor incidencia de ellos, lo que permite aplicar adecuaciones para mejorar los protocolos de monitoreo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

**Bertozi** SJ, Storms Z, Sauvageau D. Host receptor for bacteriophage adsorption. *Microbiol Lett* **2016**;4:363-393.

**Briggiler** MM, Moineau S, Quiberoni A. Bacteriophage and dairy fermentations. *Bacteriophage* **2012**;2:149-158.

**Briggiler** MM, Suárez VB, Quiberoni A, Pujato SA. Inactivation of dairy bacteriophages by thermal and chemical treatments. *Viruses* **2019**;11:480-508.

**Brown** J, Ward L, Davey, G. Rapid isolation and purification of lactococcal bacteriophage DNA without the use of caesium chloride gradients. *Lett Appl Microbiol* **1994**;18:292-293.

**Brüssow** H. Phages of dairy bacteria. *Annu Rev Microbiol* **2001**;55:283-303.

**Casey** E, Mahony J, O'Connell-Motherway M, Bottacini F, Cornelissen A, Neve H, Heller K, Noben J, Bello F, Sinderen D. Molecular characterization of three *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages. *Appl Environ Microb* **2014**;80:5623-5635.

**Chapot-Chartier** MP. Interactions of the cell-wall glycopolymers of lactic acid bacteria with their bacteriophages. *Front Microbiol* **2014**;5:1-10.

**Chen** C, Zhao S, Hao G, Yu H, Tian H, Zhao G. Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *Int J Food Prop* **2017**;20:316–330.

**Cormier** J, Janes M. A double layer plaque assay using spread plate technique for enumeration of bacteriophage MS2. *J Virol Methods* **2014**;196:86-92.

**Cornelissen** A, Sadovskaya I, Vinogradov E, Blangy S, Spinelli S, Casey E, Mahony J, Noben J, Bello F, Cambillau C, Sinderen D. The baseplate of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophage Ld17 harbours a glycerophosphodiesterase. *J Biol Chem* **2016**;291:16816-16827.

**Cota** I. Epigenetic control of O-antigen chain length in *Salmonella enterica*. *Cent Res Agric Genomics* [series en internet] 2016 [consultado 2019 enero 27]:29. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/327176479\\_Epigenetic\\_control\\_of\\_O-antigen\\_chain\\_length\\_in\\_Salmonella\\_enterica](https://www.researchgate.net/publication/327176479_Epigenetic_control_of_O-antigen_chain_length_in_Salmonella_enterica).

**Del Castillo** SR, Mestres LJ. *Productos lácteos: tecnología*. 1a. edición. España: Ediciones UPC, **2004**;103.

**Del Rio B**, Binetti AG, Martín MC, Fernández M, Magadán AH, Alvarez MA. Multiplex PCR for detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol* **2007**;24:75-81.

**Didelot S**, Kotsopoulos SK, Lupo A, Pekin D, Li X, Atochin I, Srinivasan P, Zhong Q, Olson J, Link DR, Laurent-Puig P, Blons H, Hutchison JB, Taly V. Multiplex picoliter droplet digital PCR for quantitative assessment of DNA integrity in clinical samples. *Clin Chem* **2013**;59:815-823.

**FAO**. Food and Agriculture Organization. Fichas técnicas. Procesados de lácteos, Estados Unidos, **2014**.

**FAO/WHO**. Food and Agriculture Organization - World Health Organization. Leches fermentadas. En: Codex Alimentarius. Leche y productos lácteos. 2a. edición. Roma: Editorial FAO, **2011**;6-8.

**Fernandes S**, São-José C. Enzymes and mechanisms employed by tailed bacteriophages to breach the bacteria cell barriers. *Viruses* **2018**;8:396-418.

**Fernández L**, Escobedo S, Gutiérrez D, Portilla S, Martínez B, García P, Rodríguez A. Bacteriophages in the dairy environment: from enemies to allies. *Antibiot J* **2017**;6:2-14.

**Fox PF**, McSweeney PL, Cogan TM, Guinee TP. Cheese: chemistry, physics and microbiology. 4a. edición. Irlanda: Editorial Elsevier, **2017**;vol.1:232-243.

**Gherna RL**. Culture Preservation. En: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR (Eds). *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington, **1994**;278–292.

**Gil A**. Composición y características fisicoquímicas de la leche. 3a. edición. En: Tratado de nutrición. Composición y calidad nutritiva. España: Editorial Médica Panamericana, **2017**;6-10.

**Herve-Jimenez L**, Guillouard I, Guedon E, Boudebouze S, Hols P, Monnet V, Maguin E, Rul F. Postgenomic analysis of *Streptococcus thermophilus* cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine and iron metabolism. *Appl Environ Microbiol* **2009**;7;2062-2073.

**Howard-Varona C**, Hargreaves K, Abedon S, Sullivan M. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *Isme J* **2017**;11:1511-1520.

**IDF.** Dairy sustainability outlook [monografía en internet]. Bélgica: International Dairy Federation, 2018. [Consultado 2019 enero 1];1:13-14. Disponible en: [https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2018/12/IDF\\_Dairy\\_Sustainability\\_Outlook\\_2018\\_web.pdf](https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2018/12/IDF_Dairy_Sustainability_Outlook_2018_web.pdf).

**Jakociuné D,** Moodley A. A rapid bacteriophage DNA extraction method. *Methods Protoc.* **2018**;27:2-5.

**Jurczak K,** Gasior T, Nejman F, Bloch S, Dydecka A, Topka G, Necel A, Jakubowska D, Narajczyk M, Richert M, Mieszkowska A, Wróbel B, Wegrzyn G, Wegrzyn A. Biodiversity of bacteriophage: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Sci Rep* **2016**;4:338-355.

**Kropinski A,** Mazzocco A, Waddell T, Lingohr E, Johnson R. *Bacteriophages.* EUA; Springer Press, **2009**;vol.1:69-76.

**Kurtböke I.** *Bacteriophages.* Croacia: InTech Editorial, **2012**;3.55.

**Lee P,** Costumbrado J, Hsu C, Kim Y. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp* **2012**;62:1-5.

**Linares D,** O'Callaghan T, O'Connor P, Ross R, Stanton C. *Streptococcus thermophilus* APC151 strain is suitable for the manufacture of naturally GABA-enriched bioactive yogurt. *Front Microbiol* **2016**;7:1876-1885.

**Ly-Chantain M,** Durand L, Rigobello V, Vera A, Demarigny Y. Direct quantitative detection and identification of *Lactococcal* bacteriophages from milk and whey by real-time PCR: application for the detection of *Lactococcal* bacteriophages in goat's raw milk whey in France. *Int J Microbiol* **2011**;59:369-378.

**Mahony J,** McDonnell B, Casey E, Sinderen D. Phage-host interaction of cheese-making lactic acid bacteria. *Annu Rev Food Sci Technol* **2016**;7:267-285.

**Marcó MB,** Moineau S, Quiberoni A. Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* **2012**;2:149-158.

**Martín I,** García T, Fajardo V, Rojas M, Hernández P, González I, Martín R. Real-time PCR for quantitative detection of bovine tissues in food and feed. *J Food Prot* **2008**;71:564-572.

**McDonnell** B, Mahony J, Neve H, Hanemaaijer L, Noben, J, Kouwen T, Sinderen D. Identification and analysis of a novel group of bacteriophages infecting the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **2016**;82:5153-5165.

**Mercanti** DJ, Ackermann H, Quiberoni A. Characterization of two temperate *Lactobacillus paracasei* bacteriophages: morphology, kinetics and adsorption. *Intervirology* **2015**;1:49-56.

**Michelsen** O, Cuesta-Dominguez A, Albrechtsen B, Jensen P. Detection of bacteriophage-infected cells of *Lactococcus lactis* by using flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* **2007**;73:7575-7581.

**Norgen Biotek Corporation**. Phage DNA isolation kit. [monografía en internet]. Canada: Norgen Biotek Corporation, 2014. [Consultado 2019 octubre 15]. Disponible en: <https://norgenbiotek.com/sites/default/files/resources/Phage-DNA-Kit-Insert-PI46800-5-M14.pdf>

**OECD/FAO**, OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025; OECD Publishing, Paris, France, **2016**.

**Pepper** IL, Gerba CP, Gentry J. Environmental microbiology. 3a edición. USA: Academic Press, **2015**:195-212.

**Pujato** SA, Quiberoni A, Mercanti DJ. Bacteriophages in dairy foods. *J Appl Microbiol* **2018**;126:14-30.

**Quiberoni** A, Auad L, Binetti AG, Suarez VB, Reinheimer JA, Raya RR. Comparative analysis of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from yogurt industrial plant. *Food Microbiol* **2003**;20:461-469.

**Rakhuba** DV, Kolomiets EI, Szwajcer E, Novik GI. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol J Microbiol* **2010**;59:145-155.

**Reinheimer** J, Zalazar C, comp. Avances en microbiología bioquímica y tecnología de quesos. Argentina: Editorial Centro de Publicaciones Universidad Nacional del Litorales, **2007**;100-125.

**Rodríguez-Bernal** JM, Serna-Jiménez JA, Uribe-Bohórquez MA, Klotz B, Quintanilla-Carvajal MX. Application of response surface methodology to evaluate the

effect of the concentration of sugar and commercial starters on the fermentation kinetics of yogurt. *Rev Mex Ing Quim* **2014**;13:213-225.

**Rodríguez** GA, Martínez FB. Leche y Derivados Lácteos. En: *Microbiología de Alimentos*. Guerrero LI, García-Almendárez BE, Wachter RM, Regalado-González C. Edts. Limusa, **2014**;129-144.

**Rul** F. Yogurt: microbiology, organoleptic properties and probiotic potential. En: *Fermented Foods, Part II: Technological Interventions*. 1a. edición. Estados Unidos: CRC Press, **2017**;525-526.

**Sambrook** J, Russell DW. Purification of bacteriophages  $\lambda$  particles by pelleting/centrifugation. En: *Molecular cloning. A laboratory manual*. 4a. edición. Estados Unidos de América: Cold Spring Harbor Laboratory Press Editorial, **2012**;vol.1:225-226.

**Salmond** GPC, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future. *Nature Rev Microbiol* **2015**;13:777–786.

**Schultz** D, Kishony R. Optimization and control in bacteria lag phase. *BMC Biol* **2013**;11:120-123.

**Secretaría de Economía**. La industria de alimentos procesados en México. [monografía en internet]. México: Secretaría de Economía, 2018. [Consultado 2019 enero 1]. Disponible en: <http://www.promexico.gob.mx/documentos/sectores/presentacion-alimentos-procesados.pdf>

**Shao** Y, Wang Z, Bao Q, Zhang H. Differential enumeration of subpopulation in concentrated frozen and lyophilized cultures of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J Dairy Sci* **2017**;11:8776-8782.

**Shende** R, Hirpurkar S, Sannat C, Rawat N, Pandey V. Isolation and characterization of bacteriophages with lytic activity against common bacterial pathogens. *Vet World* **2017**;10:973-978.

**Spreer** E. Dairy technology. En: *Milk and dairy product technology*. 1a. edición. Estados Unidos: Editorial Routledge, **2017**;13-15.

**Thermo Fisher Scientific.** 1 Kb plus DNA ladder. [monografía en internet]. EUA: Invitrogen, 2017. [Consultado 2019 octubre 15]. Disponible en:

[https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/1Kb\\_Plus\\_DNA\\_ladder\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/1Kb_Plus_DNA_ladder_man.pdf)

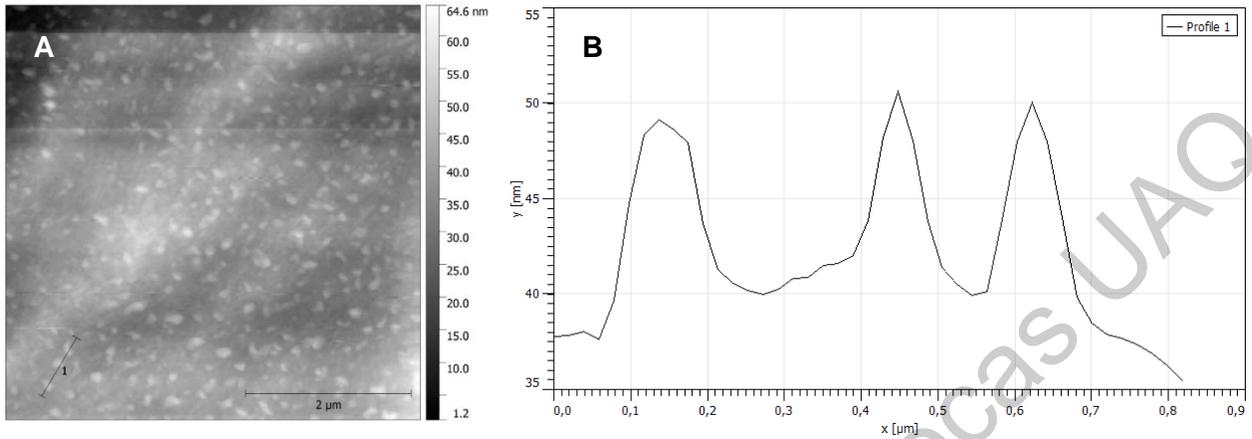
**Tortora** GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la Microbiología. 12a. edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana, **2017**;387-394.

**Zago** M, Lorentiis A, Carminati D, Camschi L, Girafia G. Detection and identification of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bacteriophages by PCR. J Dairy Res **2006**;73:146-153.

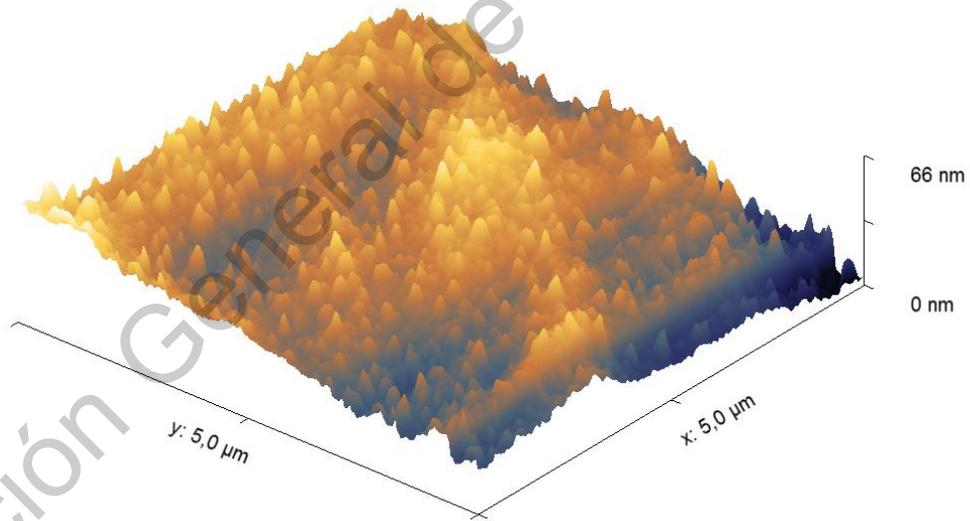
**Zhang** X, Kong J, Qu Y. Isolation and characterization of *Lactobacillus fermentum* temperate bacteriophage from chinese yogurt. J Appl Microbiol **2006**;101:857-863.

Dirección General de Bibliotecas UJAQ

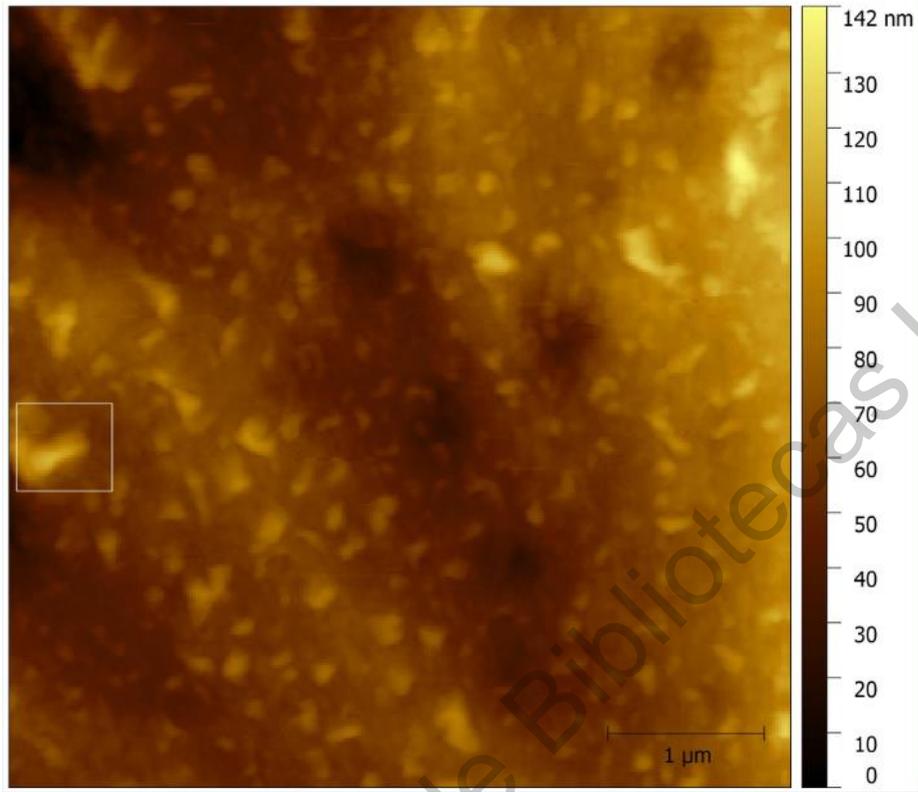
## ANEXOS



A: Microscopía de fuerza atómica (AFM) de muestra de bacteriófagos ATCC 8014 - B2. B: Perfil de altura a lo largo de la sección 1 dentro la figura AFM.



Microscopía de fuerza atómica (AFM) de muestra de bacteriófagos ATCC 8014 - B2.



Microscopía de fuerza atómica (AFM) de muestra de bacteriófagos ATCC 8014 - B2.

Dirección General de Bibliotecas UAQ