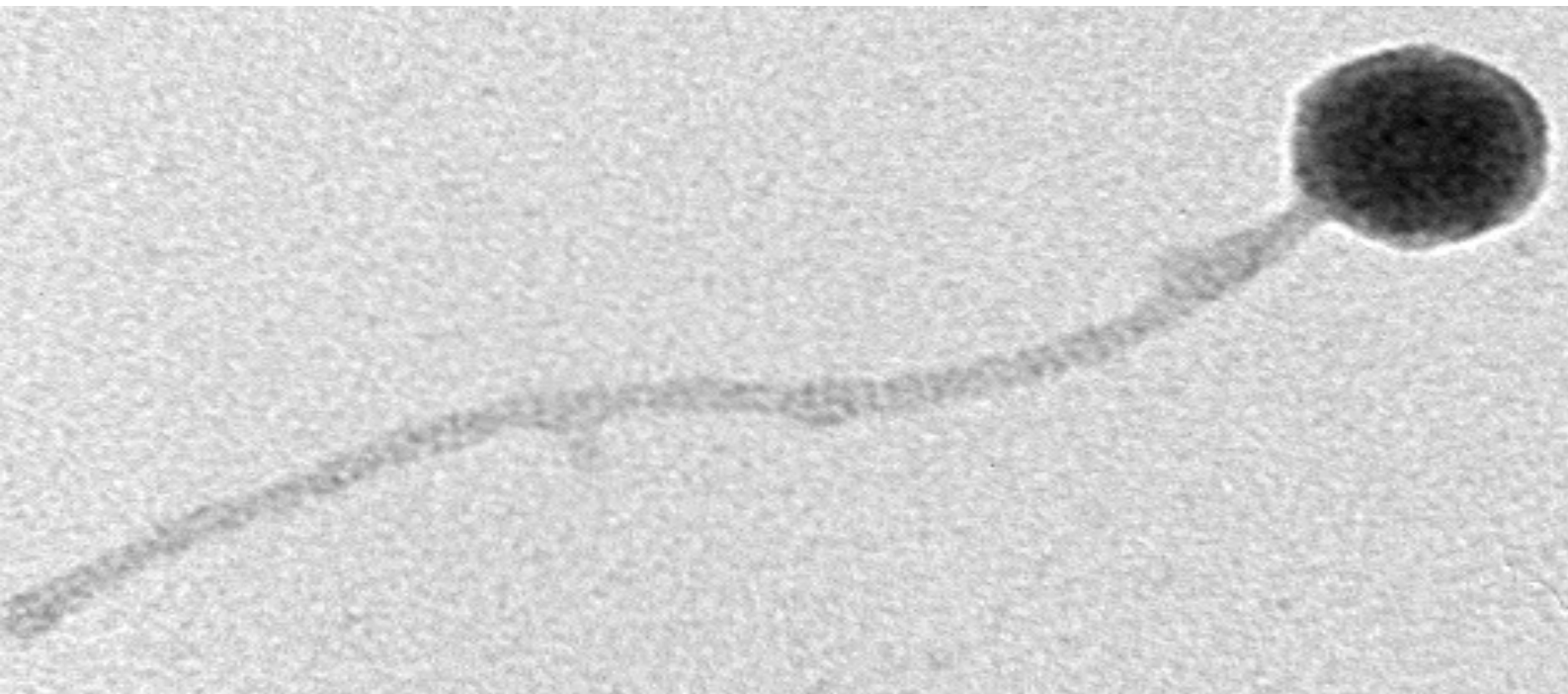




UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

Tesis para la obtención del título de Magíster en Biotecnología



**Mejoramiento para resistencia a bacteriófagos de cepas
de *Streptococcus thermophilus* de uso en la industria
láctea**

Lic. Rodrigo Achigar

Director de tesis: Dra. María Julia Pianzzola

Montevideo, abril de 2014

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Doctora María Julia Pianzzola, quién ha dirigido este trabajo. Agradecerle por haber apostado y seguir apostando por mí, por darme el espacio, las herramientas, su tiempo y dedicación para que yo pueda desarrollarme como investigador. Por ser desde hace más de cinco años ya, mi maestra en esto de hacer ciencia.

A Andrés Pellegrino de la empresa BIOMÁS S.A., impulsor de este proyecto, que confió y apostó por nosotros para comenzar a innovar en este campo. Por ser ejemplo de emprendedurismo y tenacidad.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química, a los que están y los que estuvieron. Por tantas horas compartidas ahí adentro, por su ayuda, sus consejos y por ser las únicas personas con las que se puede hablar de trabajo sin que te miren como si les hablaras en chino.

A todos los integrantes del equipo del Dr. Sylvain Moineau en la Université Laval (Quebec, Canadá), por haberme recibido y tratado tan bien durante mi estadía, especialmente a Alfonso que fue mi maestro y amigo durante esos cuatro meses de nieve y frío.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación que mediante múltiples instrumentos apoyó y financió este trabajo.

Al Gobierno de Canadá, que financió mi estadía en Quebec a través del programa ELAP.

A los miembros del tribunal por su tiempo y los valiosos aportes realizados para mejorar la calidad de este trabajo.

A los gurises por estar siempre.

A mi familia, recientemente ampliada. Especialmente a Papá y Mamá por darme todo lo que me han dado y por su apoyo incondicional, a mi hermana Lorena, porque según lo que ella dice es la que me ha enseñado todo lo que sé de biotecnología (a pesar de que es contadora) y al Tata, que siempre pregonaba el valor del estudio para ser gente.

A Momi, mi compañera de vida, que ha soportado las peores caras, las frustraciones y dolores que me ha dado esta carrera, pero también ha disfrutado las alegrías como si fueran suyas propias. Por haberme acompañado en este largo camino y por elegirme todos los días.

Por último, agradecerle a Cecilia. Agradecerle por darme el regalo de Momi y por todo el cariño que me dio desde el primer día que llegué a su casa. Por valorar e interesarse genuinamente en mi trabajo y darme siempre ánimos para que continúe y me supere. Sé que se habría sentido orgullosa por mí como pocas personas de verme dando este paso en mi carrera. A ella está dedicado este trabajo.

Índice

Resumen	1
Introducción	3
Industria láctea	3
Historia y generalidades.....	3
Industria láctea uruguaya	5
Bacterias del ácido láctico	8
Taxonomía	8
Evolución de las bacterias del ácido láctico	10
Metabolismo de carbohidratos.....	12
Metabolismo de nitrógeno	18
<i>Streptococcus thermophilus</i>	19
Generalidades.....	19
Metabolismo de azúcares por <i>Streptococcus thermophilus</i>	19
Metabolismo de nitrógeno en <i>Streptococcus thermophilus</i>	21
Bacteriófagos	23
Generalidades.....	23
Estructura de los <i>Caudovirales</i>	24
Ciclo de vida básico de un fago	24
Genómica.....	26
Fagos de <i>Streptococcus thermophilus</i>	27
Problemas a nivel industrial.....	29
El sistema inmune bacteriano CRISPR	31
Generalidades.....	31
CRISPR en <i>Streptococcus thermophilus</i>	35
Objetivos y estrategia de trabajo	37
Objetivo general	37
Objetivos específicos	37
Estrategia de trabajo	38
Creación del banco de fagos	38
Selección y obtención de resistentes.....	39
Materiales y métodos	41
Material de partida	41
Cepas bacterianas.....	41
Bacteriófagos	41
Métodos	41
Detección de fagos por PCR (método Host)	41
Detección de fagos por PCR (método múltiplex)	43
Detección y cuantificación de fagos por qPCR (tecnología SYBR Green)	44
Detección y cuantificación de fagos por qPCR (tecnología <i>Taqman</i>)	46
Aislamiento de bacteriófagos en placa - ensayos en doble capa de agar DCA	47

Multiplicación de fagos en medio líquido-método lento	48
Multiplicación de fagos en medio líquido-método rápido	49
Multiplicación de fagos en placa-ensayos DCA	50
Recuento de bacteriófagos en placa-ensayos DCA	51
Inducción de profagos con mitomicina C	52
Ensayo de sensibilidad resistencia basado en DCA- <i>spot test</i>	53
Evaluación de propiedades tecnológicas-curva de fermentación estándar	54
Ensayo de fermentación con distintas concentraciones iniciales de fago	55
Ensayo de infección para determinar variaciones en el título viral (ΔF), dependiendo de la concentración inicial de fagos.	56
Generación de mutantes fago-resistentes (BIMs) en medio líquido	57
Generación de mutantes fago-resistentes (BIMs) en medio sólido	59
Extracción de ADN bacteriano (protocolo 1)	60
Extracción de ADN bacteriano (protocolo 2)	62
Extracción de ADN viral (Lambda DNA Kit, Qiagen)	64
Extracción de ADN viral	66
Purificación de fagos por gradiente discontinuo de CsCl	67
Perfiles de restricción	69
Amplificación de las regiones CRISPR	69
Secuenciación y análisis de regiones CRISPR	71
Análisis de genomas virales	75
Resultados y discusión.....	77
Optimización de técnicas de aislamiento y detección de bacteriófagos	77
Detección de fagos por PCR.....	78
Método Host.....	78
Método multiplex.....	83
Detección y cuantificación de bacteriófagos por qPCR	85
Optimización del método utilizado SYBR Green	85
Comparación entre métodos de qPCR utilizando SYBR Green y sondas	92
Estudio de muestras proporcionadas por la industria.....	95
Ensayo de seguimiento en la planta “A”	96
Aislamiento y caracterización de bacteriófagos a partir de muestras industriales	99
Como identificar un ataque por fagos: simplificación matemática.....	99
Ensayo de fermentación con distintas concentraciones iniciales de fago	109
Ensayo de infección para determinar variaciones en el título viral (ΔF) dependiendo de la concentración inicial de fagos.	110
Construcción y caracterización de un banco de bacteriófagos de <i>Streptococcus thermophilus</i>	111
Análisis de genomas virales	115
Tablas de anotación	116
Representación gráfica de los genomas.....	134
Selección de resistentes.....	137
Obtención de resistentes	140
Análisis del sistema CRISPR como método de evaluación de cepas resistentes	147
Análisis de <i>loci</i> CRISPR	147
Estudio multigeneracional de la evolución del <i>locus</i> CRISPR1	156

Conclusiones y perspectivas.....	161
Bibliografía.....	163

Resumen

La producción de alimentos fermentados es una de las tecnologías de procesamiento de alimentos mas antigua conocida por el hombre. Desde los comienzos de la civilización, se han descrito diferentes métodos de fermentación de leche, vegetales y carne, conociéndose registros tan antiguos como de 6000 AC.

La mayoría de los alimentos fermentados dependen de bacterias del ácido láctico (BAL) para llevar a cabo el proceso. Los productos finales del metabolismo de carbohidratos de las BAL, no solo contribuyen a la preservación del alimento, sino que son responsables del sabor, aroma y textura de los mismos. La fermentación incluso puede mejorar el potencial nutricional del alimento, aumentando la digestibilidad de los mismos.

En Uruguay, la industria láctea es una de las actividades de mayor y más sostenido crecimiento en la última década, con un aumento en la leche destinada a la producción de quesos de un 76% en este período.

Los ataques fágicos son hoy en día la causa más común de fermentaciones lentas o incompletas a nivel industrial. Contaminación con fagos virulentos puede resultar en la lisis de los cultivos iniciadores en la tina de fermentación, causando fermentaciones lentas o incluso la falla total del proceso, con la consecuente pérdida de la producción.

En conjunto con la empresa importadora de fermentos BIOMÁS S.A., se inició en 2010 este trabajo en busca de soluciones a la problemática de las contaminaciones fágicas en el ambiente industrial uruguayo. Se realizaron muestreos en plantas de producción de quesos de todo el país. Se optimizaron técnicas de detección de fagos por PCR y qPCR y a partir de las muestras positivas se realizó el aislamiento de los fagos presentes a los cuales eran sensibles las 50 cepas comerciales de *Streptococcus thermophilus* que poseíamos. A partir de los fagos aislados se construyó el primer banco de bacteriófagos de *Streptococcus thermophilus* nacionales.

Por último se realizaron ensayos de selección y obtención de resistentes, así como análisis del sistema inmune bacteriano CRISPR, obteniendo una colección de cepas mejoradas con potencial para ser utilizadas como iniciadores a nivel industrial.

Introducción

Industria láctea

Historia y generalidades

La producción de alimentos fermentados es una de las tecnologías de procesamiento de alimentos más antigua conocida por el hombre. Desde los comienzos de la civilización, se han descrito diferentes métodos de fermentación de leche, vegetales y carne, conociéndose registros tan antiguos como de 6000 AC (Fox, 1993). Estos procesos eran de naturaleza artesanal y paulatinamente, fueron estableciéndose tradiciones de elaboración, en las cuales la manipulación y almacenamiento de ciertas materias primas, resultaban en el desarrollo de alimentos que no solamente poseían cualidades superiores a los originales, sino que además, adquirían características organolépticas deseables. Estas metodologías y conocimientos se fueron transfiriendo de generación en generación dentro de las comunidades locales, monasterios o estados feudales. Estos grupos, generalmente producían pequeñas cantidades del producto, el cual era distribuido o comercializado en el área próxima (Caplice et al., 1999). A mediados del siglo XIX, dos eventos impactaron de manera muy significativa en la forma de producir alimentos fermentados y en la comprensión de dichos procesos. Por un lado, la revolución industrial resultó en la concentración de población en ciudades y pueblos lo que derivó en que los métodos tradicionales de elaboración y distribución de alimentos ya no fueran eficaces para cubrir la demanda. Esto requirió la elaboración de los productos en grandes cantidades, conduciendo a la industrialización de los procesos de manufactura. Por otra parte, el florecimiento de la microbiología como ciencia a partir de la década de 1850 en adelante, resultó en el entendimiento de las bases biológicas de la fermentación. Se comprendió el rol esencial de bacterias, levaduras y hongos filamentosos en la elaboración de alimentos lo que permitió fermentaciones más eficientes y controladas. Sin embargo, el enfoque tradicional de re inoculación (inoculación de la materia prima con pequeñas cantidades de producto elaborado o subproductos) o incluso fermentación natural (llevada a cabo por la flora presente naturalmente en la materia prima o el ambiente) no resultaba apropiado como base de un proceso de elaboración a gran escala. El surgimiento del comercio minorista y el marketing en masa, requirió la disponibilidad de alimentos de calidad y seguridad estandarizadas. Hacia fines del siglo XIX, para muchos productos fermentados, especialmente los derivados de la leche, la caracterización de los microorganismos responsables de la fermentación, condujo al aislamiento de cultivos iniciadores, los cuales podían ser producidos a gran escala y abastecer las fábricas. Este

importante desarrollo tuvo un gran impacto en los procesos de elaboración, contribuyendo a garantizar la consistencia del producto y fiabilidad de la fermentación.

Actualmente, la producción de alimentos fermentados es llevada a cabo a escala industrial y con un nivel elevado de sofisticación tecnológica. Sin embargo, existen regiones y/o productores que aún realizan su producción de forma tradicional, lo que redundaría en un valor agregado al producto. El concepto de re inoculación (uso del llamado suero fermento) es aún muy utilizado en la producción de quesos. De hecho, muchos de estos quesos artesanales son considerados productos Premium, porque conservan el aroma y características particulares únicos de la región o de la granja. Sin embargo, parece inevitable e incluso irónico que a medida que la demanda de estos productos Premium aumenta, la única forma de satisfacerla es escalando los procesos a nivel industrial, en donde el uso de cultivos iniciadores definidos resulta esencial. Esto tiene muchas veces como consecuencia la pérdida de las propias características que le otorgaban singularidad y popularidad al producto. El escalado de los procesos sin pérdida de sus características, es uno de los grandes desafíos para los científicos y tecnólogos en el área (Caplice et al., 1999).

El objetivo original y primario de la fermentación en la producción de alimentos, era obtener un efecto preservador sobre el mismo. Sin embargo, con el desarrollo de nuevas tecnologías de preservación efectivas, este se dejó de ser el principal objetivo. Muchos de estos alimentos son elaborados por su sabor, textura y aroma únicos, los cuales son apreciados por los consumidores. Aún así, incluso en estas situaciones, las condiciones generadas por la fermentación del sustrato son esenciales para la preservación y seguridad microbiológica del producto. La preservación de alimentos mediada por fermentación, implica la oxidación de carbohidratos y derivados, para generar productos finales los cuales son generalmente ácidos, alcoholes y dióxido de carbono. Estos productos ayudan a controlar el crecimiento de microorganismos que puedan deteriorar el alimento, y, como la oxidación es parcial, el alimento retiene suficiente energía como para seguir siendo nutritivo para el consumidor. Estrictamente hablando, una fermentación es el consumo anaerobio de carbohidratos para obtener energía por parte de los microorganismos. Sin embargo, este término comúnmente incluye todos los procesos biológicos, tanto aerobios como anaerobios, llevados a cabo por el microorganismo durante la elaboración del alimento.

La mayoría de los alimentos fermentados dependen de bacterias del ácido láctico (BAL) para llevar a cabo el proceso. Los productos finales del metabolismo de carbohidratos de las BAL, no solo contribuyen a la preservación del alimento, sino que son responsables del sabor, aroma y textura de los mismos. La fermentación incluso puede aumentar el potencial nutricional del alimento, aumentando la digestibilidad de los mismos (Caplice et al., 1999).

Industria láctea uruguaya

En Uruguay, la industria láctea es una de las actividades de mayor y más sostenido crecimiento en la última década. Datos obtenidos del Instituto Nacional de la Leche (INALE) muestran que el volumen de leche remitido a planta (es decir el volumen de leche industrializada) paso de 1.109 millones de litros de leche en el año 2002 a 1.959 millones en el año 2012, lo que significó un crecimiento del 76% en diez años (Figura 1).

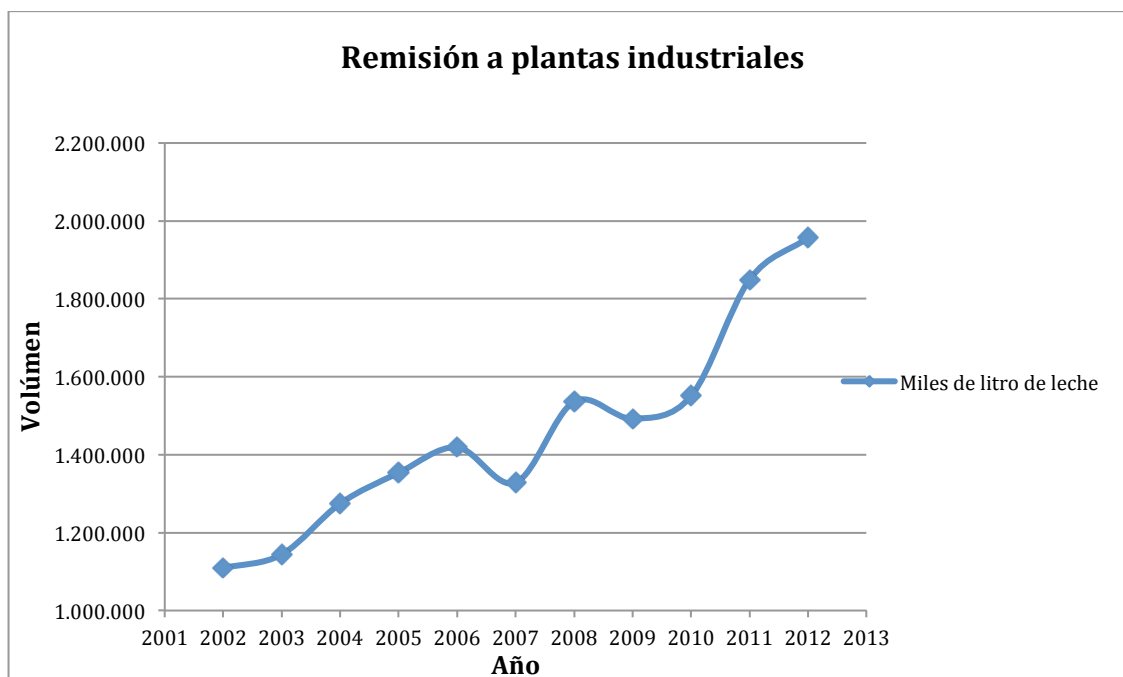


Figura 1: volumen de leche remitido a planta en el período 2002-2012. Datos obtenidos de www.inale.org

La producción de queso para abastecer el mercado interno también ha aumentado un 67% en el quinquenio 2007-2012 pasando de una producción de 9.367 toneladas en el año 2007 a 15.733 en el año 2012 (Figura 2) Esto ha significado un aumento en la facturación, desde aproximadamente 787 millones de pesos en 2007 a aproximadamente 1.830 millones de pesos en 2012. Finalmente, el volumen de producción de quesos destinados a la exportación (Figura 3), ha crecido en el mismo período desde 29.339 toneladas en 2007 a 46.964 en 2012 (Figura 4). Esto ha significado una facturación para el sector de cerca de 265 millones de dólares en 2012. Estos datos y tendencias demuestran lo importante que es esta industria para la economía de nuestro país, siendo el área de producción industrial de quesos para exportación la que reporta mayores beneficios económicos, y por ende, a la que se le debe prestar mayor atención a la hora de llevar adelante procesos de innovación y mejora.

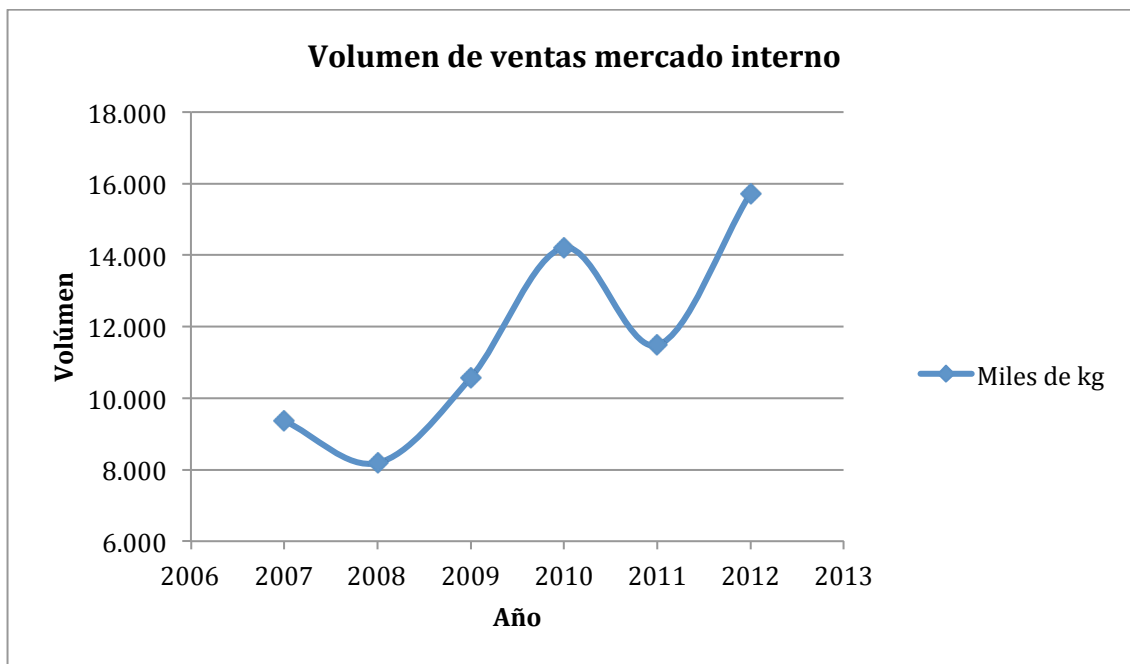


Figura 2: ventas de queso en el mercado interno en el período 2007-2012. Datos obtenidos de www.inale.org

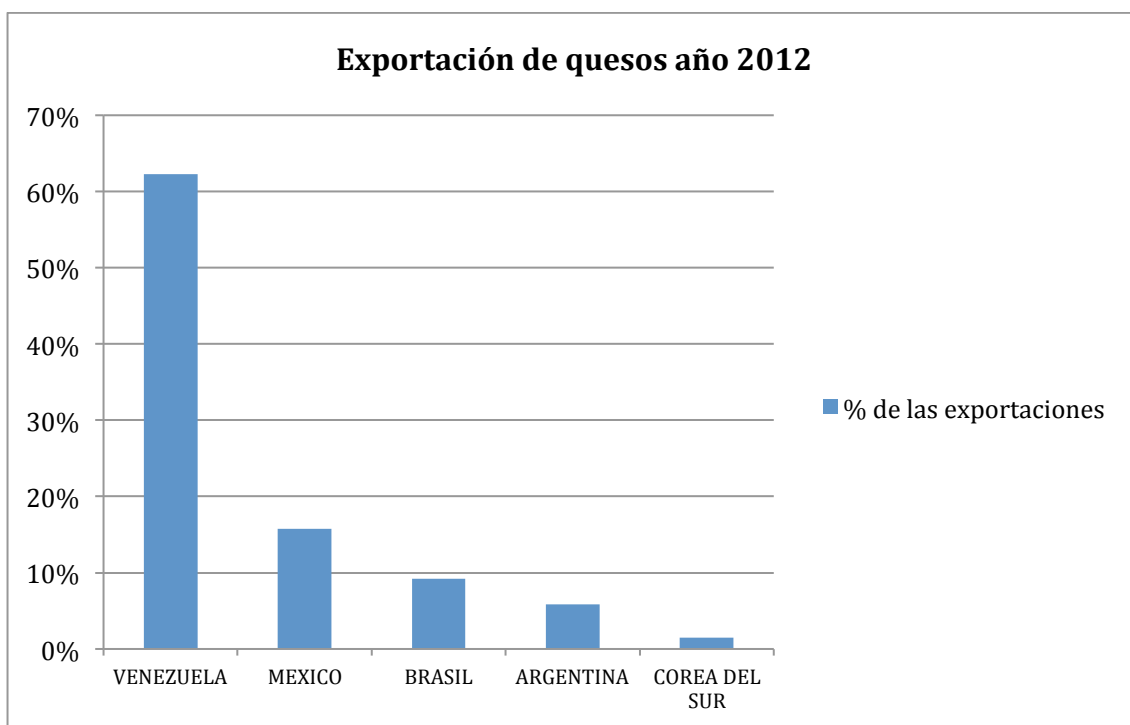


Figura 3: distribución de exportaciones de queso en el año 2012. Datos obtenidos de www.inale.org



Figura 4: exportación de quesos en el período 2007-2012. Datos obtenidos de www.inale.org

Bacterias del ácido láctico

Durante el siglo XX, el término bacterias del ácido láctico (BAL) se usó para referirse a los microorganismos responsables de agriar la leche. Mientras más similitudes comenzaron a observarse entre estos microorganismos y otros productores de ácido láctico, se hizo necesario establecer criterios claros para su clasificación. El trabajo de Orla-Jensen en 1919, sentó las bases para la clasificación de las BAL (morfología, fermentación de glucosa, rangos de temperatura y patrones de utilización de azúcares), y hasta el día de hoy sigue siendo muy importante, a pesar del advenimiento de nuevas tecnologías de caracterización molecular (Lahtinen et al., 2011). Estos nuevos desarrollos, han ayudado a ampliar el grupo, incluyéndose nuevos géneros diferentes a los cuatro originales de Orla-Jensen: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*.

Las BAL han sido tradicionalmente relacionadas con fermentación de alimentos, y son generalmente consideradas como organismos beneficiosos. Sin embargo, algunos géneros (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Carnobacterium*) contienen especies o cepas reconocidas como patógenos humanos o animales. Es por esto, que un entendimiento profundo de la taxonomía, metabolismo y biología molecular de las BAL es necesario para maximizar el aprovechamiento de las propiedades tecnológicas de estos organismos, evitando los riesgos potenciales.

Taxonomía

Las BAL constituyen un grupo de bacterias Gram positivas, cocos o bacilos, no esporulantes, anaerobias aerotolerantes, que producen ácido láctico como producto final del metabolismo de carbohidratos. Carecen de la enzima catalasa y están desprovistos de citocromos. Según la clasificación actual, pertenecen al *phylum Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*. Las diferentes familias incluyen a los *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*.

A nivel filogenético, las BAL se clasifican de acuerdo a la secuencia del ARNr 16S. Las BAL ancestrales, habrían sido aparentemente organismos tipo bacilo habitantes del suelo, que subsecuentemente perdieron genes y su fenotipo asociado, a la vez que se adaptaban a nuevos nichos ecológicos nutricionalmente ricos.

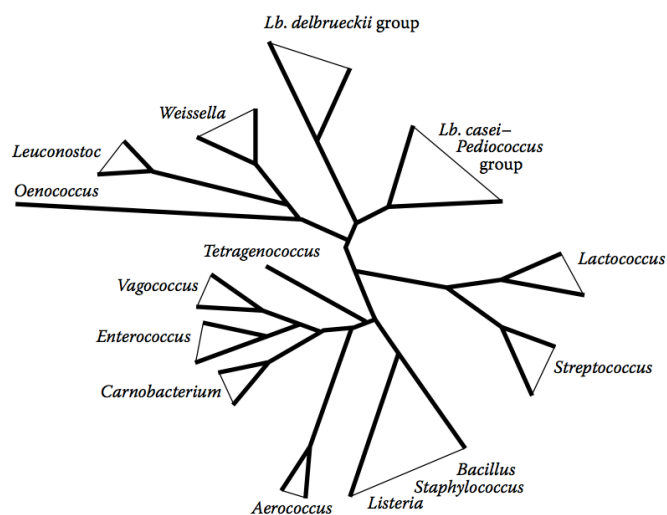


Figura 5: árbol filogenético para el gen del ARNr 16S de bacterias ácido lácticas (Lahtinen et al., 2011)

Tabla 1: características morfológicas y fisiológicas de las BAL. (Lahtinen et al., 2011)

Familia	Género	Características								
		Forma	Gas de glucosa	Crecimiento a 10°C	Crecimiento a 45°C	Crecimiento en 6,5% NaCl	Crecimiento en 18% NaCl	Crecimiento a pH 4.4	Crecimiento a pH 9.6	Ácido láctico
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	Coco	-	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	Bacilo	-	+	-	ND	-	ND	-	L
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	Coco	-	+	+	+	-	+	+	L
	<i>Tetragenococcus</i>	Coco		+	-	+	+	Var	+	
	<i>Vagococcus</i>	Coco		+	-	-	-		-	
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	Bacilo	Var	Var	Var	Var	-	Var	-	L, D, DL
	<i>Pediococcus</i>	Coco	-	Var	Var	Var	-	+	-	L, DL
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	Coco	+	+	-	Var	-	Var	-	D
	<i>Oeococcus</i>	Coco	+	+	-	Var	-	Var	-	D
	<i>Weissella</i>	Var	+	+	-	Var	-	Var	-	D, DL
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	Coco	-	+	-	-	-	Var	-	L
	<i>Streptococcus</i>	Coco	-	-	Var	-	-	-	-	L

Var: variable; ND: no determinado

Evolución de las bacterias del ácido láctico

Las BAL pertenecen al *phylum Firmicutes*, clase *Bacilli*. Se cree que el ancestro común de este grupo poseía 3000 genes potenciales, mientras que las BAL actuales presentan por lo general genomas pequeños (3,5 Mb) y unos 2000 genes potenciales (Lahtinen et al., 2011).

Pérdida de genes

Análisis evolutivos de diferentes BAL, sugieren que el camino hasta la aparición de los *Lactobacilliales* desde el ancestro común de todos los *Bacilli* implicó la pérdida de alrededor de 1000 genes. Esta pérdida involucra todo el set de genes vinculados con la esporulación, genes codificantes de citocromos tipo hemo-cobre, algunos cofactores y genes codificantes de catalasa. Algunas especies (por ejemplo *Lactobacillus. delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) muestran una mayor prominencia aún de pérdida de genes y un alto número de pseudogenes, posiblemente relacionada con la especificidad del nicho ecológico que ocupan (Kira et al., 2007).

Algunas pérdidas adicionales ocurrieron durante la evolución de los diferentes linajes de BAL, resultando en un arreglo final de su árbol evolutivo dividido en cinco grandes ramas: *Lactococcus-Streptococcus*, *Enterococcus-Tetragonococcus*, *Leuconostoc-Oenococcus-Weisella-Fuctobacillus*, *Pediococcus-Lb casei* y *Lb delbrueckii* (Figura 5) (Lahtinen et al., 2011).

Adquisición de genes

Las BAL han adquirido nuevas familias de genes mediante duplicación y por eventos de transferencia horizontal (HGT). Los eventos de conjugación, transformación, transducción e inserción (IS) deben de haber tenido también un rol particular en la adquisición de nuevos genes, si bien aquellos asociados a transducción o reordenamiento mediados por elementos IS, son más fáciles de apreciar en la información genómica actual.

La HGT es una gran fuerza modeladora en los genomas de las BAL. Entre los 86 genes presuntamente adquiridos por el ancestro de todos los *Lactobacilliales*, únicamente dos no tienen ortólogos fuera de este grupo. Análisis genómicos de una cepa de *Bifidobacterium* han mostrado que aproximadamente el 5% del contenido del genoma habría sido adquirido recientemente por eventos de HGT (Makarova et al., 2006).

Un ejemplo de genes parálogos es la presencia de dos secuencias codificantes de la

enzima enolasa en *Lactobacillus*. Análisis filogenéticos mostraron que una de las enolasas de los *Lactobacilliales* es la versión ancestral presente en virtualmente todos los *Firmicutes*, mientras que la otra aparentemente habría sido adquirida por una BAL ancestral.

Todas las secuencias genómicas de BAL están caracterizadas por una gran presencia de secuencias de inserción (IS), lo que indica el papel central en la evolución de este grupo. Un buen ejemplo de plasticidad mediada por IS es el de *Lb. helveticus*, la cual se ha diversificado desde su ancestro habitante de la flora intestinal no solamente por la pérdida selectiva de genes sino también por la adquisición de más de 200 secuencias de inserción, encontrándose en su genoma 16 agrupamientos de marcos abiertos de lectura (ORFs) flanqueados por secuencias de inserción (Lahtinen et al., 2011).

Adaptación al ambiente lácteo

Las BAL están asociadas a la producción de prácticamente todos los alimentos lácteos. Sin embargo, algunas especies usadas comúnmente como cultivos iniciadores o que naturalmente se desarrollan durante la producción de queso, están estrechamente relacionadas filogenéticamente con otras especies bacterianas incapaces de crecer en leche. Por lo tanto, la habilidad de fermentar lactosa y degradar proteínas de la leche son las principales adaptaciones al medio lácteo que presentan las BAL (Lahtinen et al., 2011).

Los primeros estudios publicados acerca de la genética de las BAL demostraron que los genes vinculados a la utilización de lactosa por parte de BAL mesófilas se encontraban codificados en plásmidos. Por otra parte, las BAL termófilas mostraron poseer al menos parte de su sistema caseinolítico codificado en plásmidos, mientras que los genes vinculados al metabolismo de lactosa estaban localizados en el genoma (Lahtinen et al., 2011).

Una comparación interesante fue realizada entre la cepa láctea *Lb. helveticus* DPC4571 y la intestinal *Lb. acidophilus* NCFM. Estas bacterias comparten un 98,4% de identidad en sus genes 16S ribosomales, lo que sugiere un estrecho relacionamiento filogenético a pesar de ocupar nichos ecológicos tan diferentes. El análisis de genomas completos mostró que el 75% de los genes de DCP4571 poseen ortólogos en NCFM (O'Sullivan et al., 2009). Sin embargo, DCP4571 posee 123 genes ausentes en NCFM, mientras que esta posee 503 genes exclusivos. Entre estos 626 genes nicho-específicos, aquellos vinculados a proteólisis y resistencia a bacteriófagos resultaron ser específicos para el ambiente lácteo. La especificidad de los genes relacionados a la proteólisis puede parecer obvia ya que para crecer en leche es necesario degradar caseína en alguna medida, pero en lo que tiene que ver con resistencia a bacteriófagos la correlación no parece tan evidente. La

explicación a este fenómeno puede ser la presión selectiva a la que se someten las cepas comerciales para su uso a nivel industrial (Lahtinen et al., 2011).

Dos de las adaptaciones nicho-específicas más importantes han sido observadas en especies de *Lb. casei* (Cai et al., 2009) y *Lc lactis* (Siezen et al., 2008; Siezen et al., 2010). Ha sido demostrado mediante MLST que *Lb. casei* se separó en dos grupos hace aproximadamente 1,5 millones de años, y nuevamente hace aproximadamente 10.000 años en varias cepas diferentes. Mediante ensayos de hibridación de genomas se ha demostrado que cinco de siete aislamientos de Dinamarca, Australia, y E.E.U.U. han perdido aproximadamente el 20% de los genes presentes en el aislado ATCC 334. Los genes perdidos corresponden a proteínas hipotéticas, genes de fagos, metabolismo de carbohidratos y transporte de aminoácidos. Particularmente, se observó la pérdida de una región de 129 kb, la cual codifica el 15% del total de genes relacionados con la utilización de carbohidratos.

El análisis genómico de la cepa *Lc lactis* KF147 (aislada de plantas) ha revelado que los lactococos lácteos (*lactis* y *cremonis*) han sufrido adaptaciones dramáticas al ambiente lácteo (Siezen & Bachmann, 2008; Siezen et al., 2010). *Lc. lactis* KF147 y la cepa láctea IL1403 poseen grandes similitudes a nivel nucleotídico y en ordenamiento de genes. Sin embargo IL1403 ha perdido los genes involucrados en la degradación de la pared celular de células vegetales y de los sistemas de internalización y utilización de estos productos de degradación (Lahtinen et al., 2011).

Metabolismo de carbohidratos

Las BAL no poseen un sistema respiratorio funcional, por lo tanto deben obtener su energía a partir de fosforilación a nivel de sustrato. El metabolismo de hexosas puede seguir dos vías básicas: la vía homofermentadora y la vía heterofermentadora. La vía homofermentadora se basa en la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP, glicolisis), y virtualmente el único sub producto metabólico es el ácido láctico. La fermentación heteroláctica, produce además de lactato, CO₂, acetato o etanol. Como regla general, las pentosas pueden metabolizarse únicamente por vía heteroláctica, entrando en la ruta como ribulosa 5-fosfato o xilulosa 5-fosfato, sin producirse CO₂. Otras hexosas como fructosa (transportada como tal o como producto de la hidrólisis de sacarosa), galactosa o galactosa 6-fosfato, sufren diferentes conversiones moleculares antes de poder ser metabolizadas por la vía EMP. La fructosa es convertida en fructosa 6-fosfato utilizando ATP e ingresa a la vía EMP. La galactosa es convertida en galactosa 1-fosfato, luego a glucosa 1-fosfato y finalmente a glucosa 6-fosfato, mediante la vía de Leloir. La galactosa 6-fosfato es convertida en tagatosa 6-fosfato, luego a

tagatosa 1,6-difosfato, y luego hidrolizada a dihidroxicetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, por la vía de la tagatosa (Lahtinen et al., 2011).

Transporte de carbohidratos

Las BAL llevan a cabo el transporte de disacáridos y monosacáridos tanto por el sistema PEP-PTS (*phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system*) como por sistemas de permeasas. El mismo carbohidrato puede ser transportado por uno u otro sistema dependiendo de la especie de BAL. El sistema PEP-PTS es un sistema complejo que transloca azúcares a través de la membrana y simultáneamente las fosforila. Esta translocación no depende de gradientes de concentración y la energía del proceso es provista por el fosfato de alta energía del fosfoenolpiruvato. La energía es transportada por una cadena de proteínas específicas a una enzima localizada en la membrana celular, la cual se encarga de la translocación y fosforilación del azúcar (Figura 6).

A pesar de que sistemas de este tipo han sido encontrados en bacterias heterofermentadoras, el sistema se encuentra generalmente asociado a la vía homofermentadora.

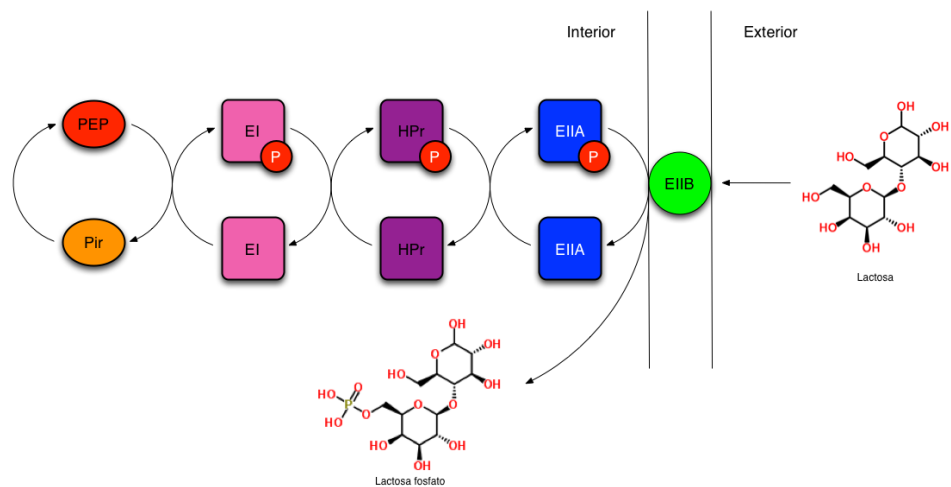


Figura 6: sistema de transporte de carbohidratos. PEP: fosfoenolpiruvato, Pir: piruvato, EI: enzima I de la cadena de transporte, HPr: enzima transportadora termoestable, EIIA: enzima azúcar-específica, EIIB: permeasa azúcar-específica.

El transporte mediado por permeasas, consiste en la captación de una molécula de azúcar junto con un protón por parte de una permeasa en la membrana, la cual sufre un cambio conformacional y libera al citoplasma la molécula de carbohidrato y un H⁺ (Lahtinen et al., 2011). Como se mencionó anteriormente, tanto mono como disacáridos pueden transportarse por cualquiera de las dos vías

dependiendo del organismo. Una vez en el interior celular, los disacáridos son hidrolizados para obtener monosacáridos fermentables. En el caso de la lactosa, esta es procesada por una beta-galactosidasa para obtener galactosa y glucosa. En el caso de la lactosa fosfato (lactosa fosforilada al haber sido transportada por el sistema PEP-PTS), los productos finales de la hidrólisis son glucosa y galactosa 6-fosfato.

Fermentación homoláctica

Las hexosas son fermentadas por especies homolácticas para producir mayoritariamente ácido láctico. Teóricamente, cada molécula de hexosa producirá dos moléculas de lactato, a través de la vía Embden-Meyerhoff-Parnas. Las especies homofermentadoras pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*.

En la vía EMP, con glucosa como sustrato, dos moléculas de ATP son utilizadas para convertir glucosa en fructosa-1,6-bifosfato. La hidrólisis de esta molécula genera dos compuestos de 3 carbonos, los cuales terminan convirtiéndose en fosfoenolpiruvato (PEP) generando ATP y NADH. El PEP puede utilizarse en el sistema de transporte PEP-PTS o convertirse en piruvato generando ATP en el proceso. El piruvato es convertido a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa, reciclandose poder reductor. El tipo de lactato producido por el microorganismo (L(+)-, D(-)- o DL-lactato) está dado por el tipo de la lactato deshidrogenasa que posea (L, D o una mezcla). La reacción global implica la producción de dos moléculas de ATP y dos de lactato a partir de una molécula de glucosa. El ácido láctico es excretado al ambiente (Figura 7) (Lahtinen et al., 2011).

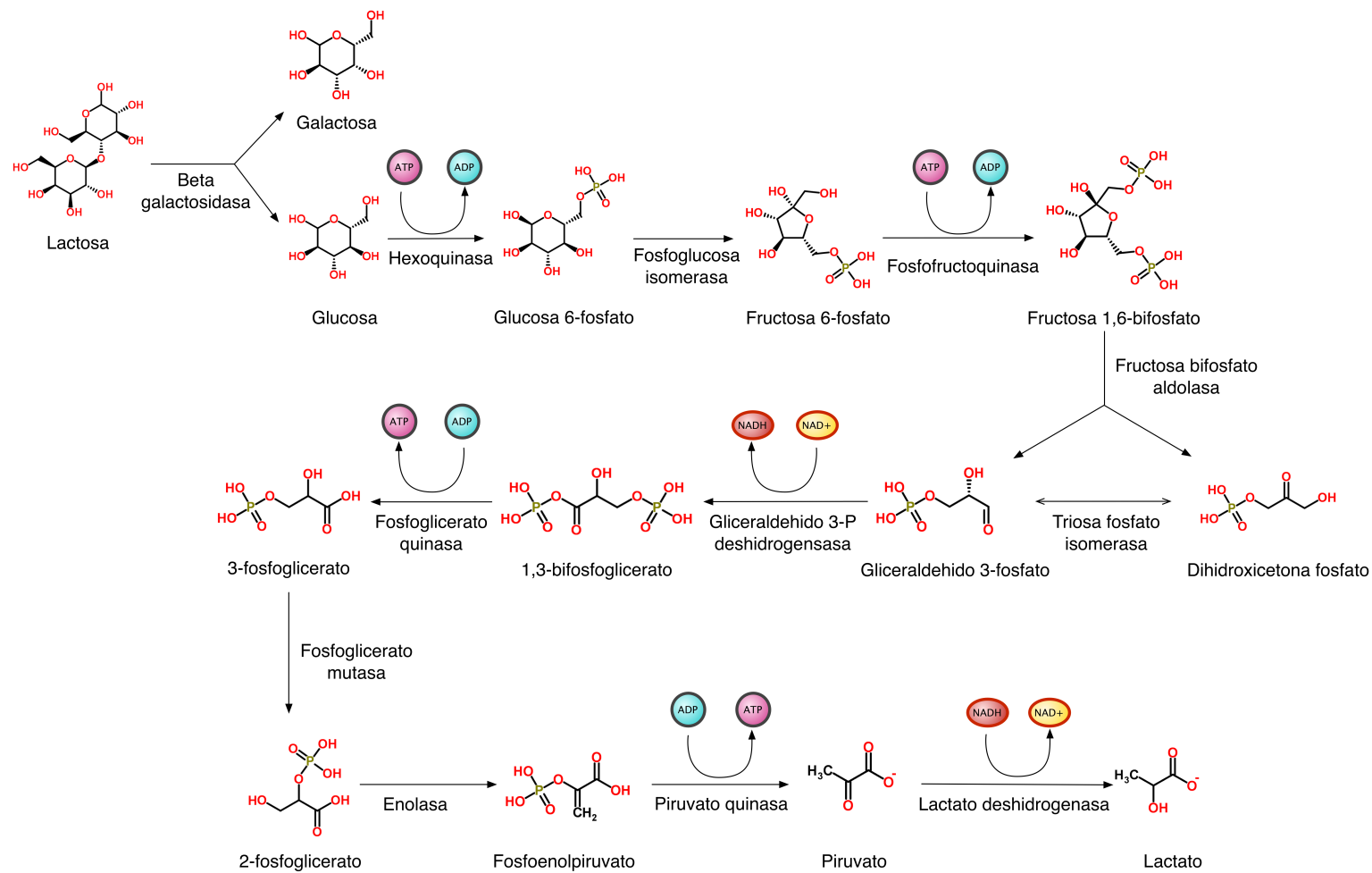


Figura 7: esquema de la fermentación homoláctica

Fermentación heteroláctica

Las bacterias con metabolismo heteroláctico, consumen hexosas y producen una mezcla de ácido láctico, CO₂ y acetato o etanol (Figura 8). Estos organismos (miembros del género *Leuconostoc* y *Lactobacillus*), carecen de la enzima fructosa bifosfato aldolasa, por lo tanto no pueden llevar a cabo la vía EMP completamente, pero poseen glucosa 6-P deshidrogenasa y xilulosa 5-P fosfoquetolasa, lo que les permite metabolizar las hexosas por la vía fosfogluconato-fosfoquetolasa para obtener energía. Esta ruta, tiene una primera fase oxidativa, en la cual a partir de glucosa se obtiene un compuesto de 5 carbonos (ribulosa 5-fosfato) y CO₂. En la fase no oxidativa, la ribulosa 5-fosfato es convertida en xilulosa 5-fosfato, la cual es hidrolizada a gliceraldehído 3-fosfato y acetyl fosfato. El gliceraldehído 3-fosfato es metabolizado a lactato siguiendo desde ese punto la vía EMP, mientras que el acetyl fosfato puede oxidarse a acetato o reducirse a etanol, dependiendo del potencial óxido-reducción (O-R) del medio. Los productos finales son excretados al ambiente.

El balance global de la fermentación heteroláctica es un mol de ATP por mol de hexosa (se producen dos moles de ATP por vía del gliceraldehído 3-fosfato a lactato, y se gasta uno en la fosforilación de la glucosa). Sin embargo, es posible obtener un ATP más, si el acetyl fosfato es oxidado a acetato, obteniéndose un balance global de dos moles de ATP por mol de glucosa consumido (Lahtinen et al., 2011).

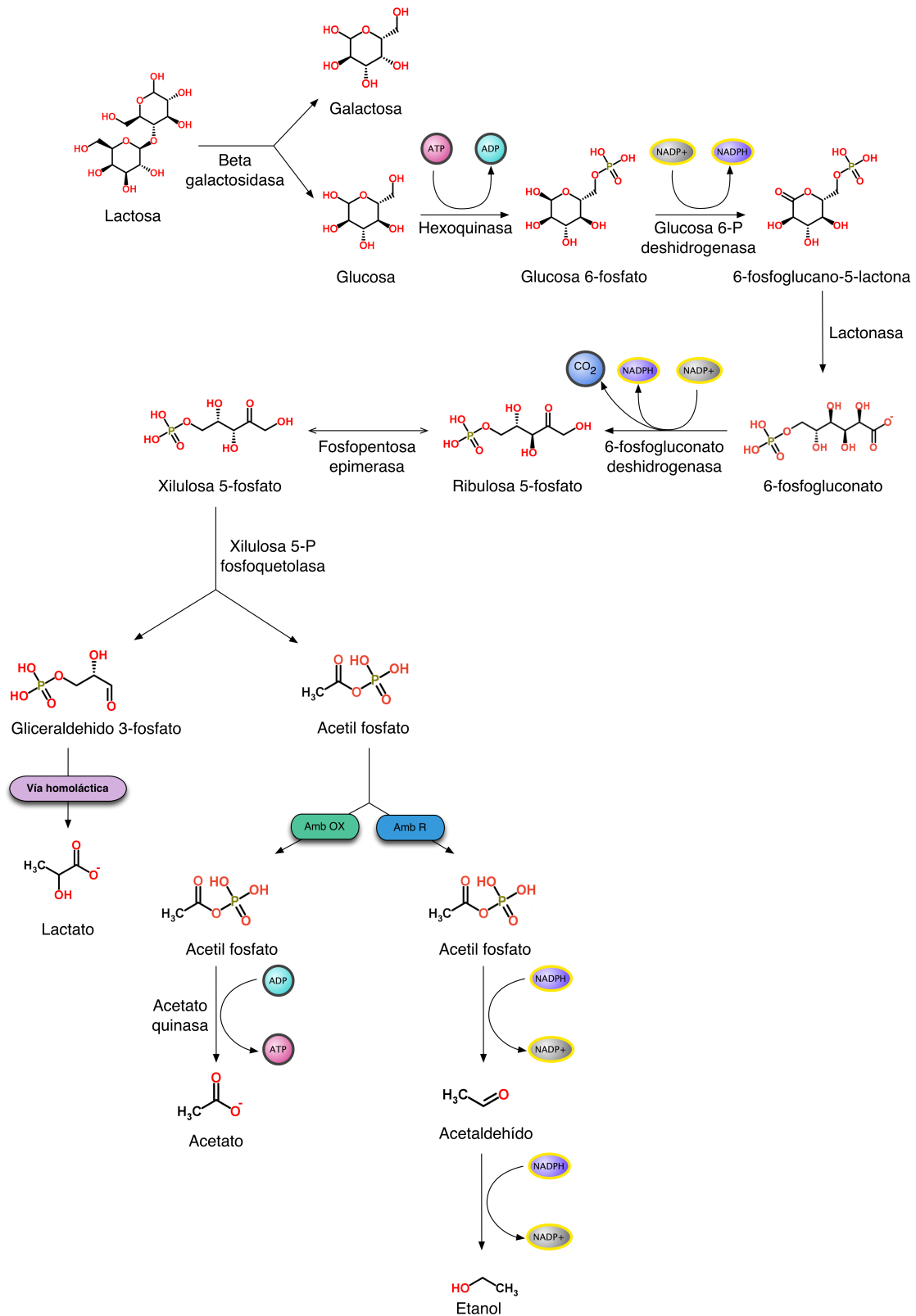


Figura 8: esquema de la fermentación heteroláctica

Metabolismo de nitrógeno

Las BAL poseen por lo general auxotrofías para varios aminoácidos (Hols et al., 2005). Dado que la leche es pobre en aminoácidos libres y péptidos cortos, el crecimiento óptimo de éstas requiere la hidrólisis de caseínas, internalización y degradación de los pequeños péptidos formados, o síntesis *de novo* de ciertos aminoácidos. Consecuentemente, su capacidad de metabolizar nitrógeno es uno de los factores de mayor importancia en la eficiencia del proceso fermentativo (Lahtinen et al., 2011).

El sistema proteolítico ha sido ampliamente estudiado en *Lactococcus*, y actualmente se lo considera como el modelo estándar (Lahtinen et al., 2011).

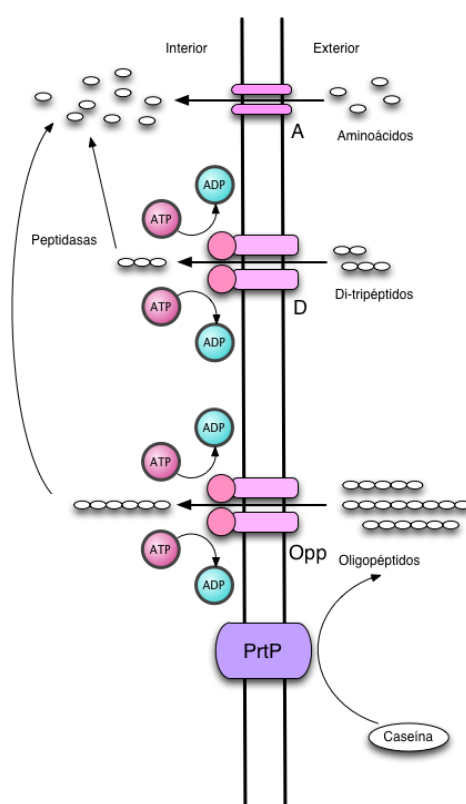


Figura 9: Esquema del sistema de degradación de proteínas y transporte de aminoácidos. PrtP: proteasa, Opp: sistema de transporte de oligopéptidos, D: sistema de transporte de dipéptidos y tripéptidos, A: sistema de transporte de aminoácidos

La actividad caseinolítica es llevada a cabo por una serin proteasa de la familia de las subtilisinas llamada PrtP, anclada a la pared celular. Esta enzima degrada caseína obteniéndose péptidos de tamaño variable. Los péptidos largos (4 a 18 aminoácidos) son transportados por un sistema de transporte de oligopéptidos (Opp), mientras que los di y tripéptidos son transportados por otro sistema (D). Estos sistemas son del tipo ABC. Dentro de las células, los péptidos son procesados por peptidasas intracelulares hasta obtener aminoácidos libres (Figura 9) (Lahtinen et al., 2011).

Streptococcus thermophilus

Generalidades

Streptococcus thermophilus es un microorganismo de gran importancia para la industria láctea dado su masivo uso en la elaboración de productos fermentados, y es considerada la segunda especie en importancia detrás de *Lactococcus lactis* (Hols et al., 2005). Es una bacteria homofermentadora, pertenece al grupo de bacterias del ácido láctico termofílica y generalmente es utilizada en combinación con *Lb. bulgaricus* para la producción de yogurt. También en combinación o solitariamente se utiliza para la producción de gran variedad de quesos (Fox, 1993), siendo la producción de quesos blandos (mozzarella, cheddar, etc.) la más importante para nuestro país.

S. thermophilus está estrechamente relacionada con *Lc. lactis*, pero aún más estrechamente relacionada con otras especies de estreptococos, algunas de las cuáles son patógenos humanos (por ejemplo *S. pneumoniae*, *S. pyrogenes* y *S. agalactiae*) causantes de neumonía y meningitis (Mitchell, 2003). Sin embargo, *S. thermophilus* es una especie considerada GRAS (*generally recognised as safe*, por sus siglas en inglés), y alrededor de 10^{21} células vivas son consumidas anualmente por la población humana (Hols et al., 2005).

Metabolismo de azúcares por *Streptococcus thermophilus*

La función principal de *S. thermophilus* en los procesos fermentativos industriales, es la rápida conversión de lactosa en ácido láctico, aunque también es capaz de contribuir a la textura y el sabor del producto final, mediante la producción de otros compuestos. *S. thermophilus* además de lactosa es capaz de fermentar otros cuatro azúcares: sacarosa, glucosa, fructosa y galactosa (Vaillancourt et al., 2002). Los productos finales de la fermentación son limitados, además del producto principal (L-lactato), se producen pequeñas cantidades de formiato, acetoína, diacetil, acetaldehído y acetato (Ott, Germond, & Chaintreau, 2000).

Las especies patógenas de estreptococos poseen la capacidad de degradar polímeros complejos como los glucanos (dextranos). Sin embargo, en *S. thermophilus* la capacidad de degradar, remodelar o sintetizar estos polímeros complejos está severamente reducida (Hols et al., 2005). Su genoma contiene tres pseudogenes (*dexT*, *pulA*, *sacB*) que codifican los remanentes de una dextranasa, una pullulanasa y una levansucrasa. Sin embargo, se encontró un gen codificante para una amilasa completo (*amyL*), lo cual se corresponde con el hecho de que esta especie posee actividad amilolítica (Slos et al., 1991).

os únicos azúcares transportados por el sistema PTS, en *S. thermophilus* son sacarosa y fructosa aunque con una eficiencia menor que el transporte de lactosa (van den Bogaard et al., 2004). La glucosa es un azúcar no PTS, y es un pobre sustrato de crecimiento (Kunji et al., 1996). *S. thermophilus* está muy bien adaptada a crecer en lactosa como única fuente de carbono, la cual es transportada al interior celular por el transportador LacS. Una vez en la célula, la lactosa es hidrolizada por la acción de la beta-galactosidasa (LacZ). Todas las cepas utilizan la glucosa obtenida de la hidrólisis, mientras que por lo general la galactosa no es metabolizada y se excreta hacia el exterior por la proteína LacS, la cual actúa como un antiporter lactosa/galactosa (Gunnewijk et al., 2000). La mayor limitación para la utilización de galactosa como fuente de carbono es la baja actividad galactoquinasa (Vaughan et al., 2001). La presencia en el genoma de gran cantidad de pseudogenes y genes no funcionales relacionados con el metabolismo de azúcares, ilustran una evolución regresiva de *S. thermophilus* hasta convertirse en una especie dedicada a la utilización de lactosa (Hols et al., 2005).

S. thermophilus es una bacteria homoláctica obligada y produce L-lactato como producto principal del metabolismo de azúcares. Sin embargo, se ha reportado que también pueden producirse pequeñas cantidades de α -acetolactato, (α -AL), acetoína, acetaldehído, formato y acetato. El crecimiento de *S. thermophilus* en leche, genera la producción de formiato, el cual juega un papel importante en la estimulación del crecimiento de *L. bulgaricus*. La producción de formiato es responsabilidad de la enzima Pfl (piruvato-formato liasa), la cual se ve fuertemente inducida durante el crecimiento de la bacteria en leche (Vinderola et al., 2002).

El número de enzimas de *S. thermophilus* capaces de reciclar piruvato es pequeño en comparación a otras especies de estreptococos y otras bacterias lácticas (Hols et al., 2005). Únicamente fueron detectadas tres enzimas para la disipación de piruvato: la L-lactato deshidrogenasa (Ldh), la piruvato-formato liasa (Pfl) y su enzima activadora (PflA) y la α -AL sintasa. En total, dos vías de disipación de piruvato diferentes a la del L-lactato fueron identificadas: la Pfl/fosfotransacetilasa, la Pta/acetato quinasa (AckA), que produce formato y acetato y la ruta Als/ α -AL decarboxilasa (AldB), que produce acetoína. También se confirmó la ausencia de genes codificantes para el complejo piruvato deshidrogenasa. La ausencia de etanol y 2-3 butanodiol como productos de fermentación, se explica porque tanto el gen que codifica la diacil/acetoín reductasa (*butA*) como dos genes codificantes para una alcohol/acetaldehído deshidrogenasa (*adhA* y *adhE*) son pseudogenes (Hols et al., 2005).

Metabolismo de nitrógeno en *Streptococcus thermophilus*

Biosíntesis de aminoácidos

S. thermophilus, al igual que la mayoría de las BAL, requiere una fuente exógena de aminoácidos para crecer. Sin embargo, es mucho menos demandante que otras BAL. Mientras que algunas cepas no requieren de ningún aminoácido en el medio, otras presentan auxotrofías hasta para cuatro aminoácidos (Hols et al., 2005). La relativamente alta conservación de genes funcionales para la biosíntesis de aminoácidos en *S. thermophilus* refleja la importancia de la síntesis para crecer en leche. Esto también se ve reflejado por la baja cantidad de pseudogenes asociados a la biosíntesis de aminoácidos. Solamente los genes *alaD*, *dapE*, *ilvD2* e *yhcE* involucrados en la biosíntesis de alanina, lisina, aminoácidos ramificados y con sulfuro, aparecen como pseudogenes en la cepa LMG 18311, mientras que la cepa CNRZ1066 carece de estos genes además de *aspC3*, que codifica la aspartato aminotransferasa (Hols et al., 2005).

Sistema proteolítico

S. thermophilus posee un sistema proteolítico similar al hallado en otras BAL y está compuesto por: una proteasa extracelular anclada en la membrana, capaz de hidrolizar caseína, un set de transportadores de péptidos y aminoácidos necesarios para la importación de los mismos y un set de proteinasas intracelulares encargadas de hidrolizar los péptidos derivados de caseína y varios procesos *house-keeping* (Hols et al., 2005). La proteína PrtS (homóloga a PrtP de *Lactococcus*) es una serin proteasa de la familia de las subtilisinas, anclada a la pared celular mediante una sortasa (Fernandez-Espla et al., 2000). PrtS esta presente en algunas cepas de *S. thermophilus*, y su presencia está asociada con fenotipos de rápida acidificación y crecimiento en leche. PrtS es esencial para un óptimo crecimiento en leche, sin embargo, las cepas de *S. thermophilus* también son capaces de crecer de forma óptima cuando son co-cultivadas con otras bacterias con buena actividad proteasa, como por ejemplo *Lactobacillus bulgaricus* (Courtin et al., 2002). Esta cooperación puede explicar la ausencia de PrtS en numerosas cepas de *S. thermophilus*. PrtS es similar a las peptidasas C5a/Csp de estreptococos patógenos y otras proteinasas asociadas a la pared de otras BAL. Sin embargo, PrtS difiere de las proteasas de otras BAL en que carece del dominio B involucrado en el proceso de auto proteólisis. Si bien el proceso de maduración de PrtS es desconocido, la peptidilprolil isomerasa putativa PrsA comparte cierta identidad con la proteína de maduración de *Lactococcus lactis* PrtM y puede estar involucrada en este proceso. Hasta el momento se han caracterizado unas pocas endopeptidasas y aminopeptidasas (PepC, PepN, PepO, PepS y PepX). Todas estas proteasas poseen homólogos en otros estreptococos y *Lactococcus lactis* (excepto PepS que no posee homólogo en *L. lactis*). Adicionalmente, el genoma de *S.*

thermophilus posee genes intactos que codifican proteasas necesarias para los procesos celulares básicos (SPasas, HtrA, Clp proteasas, carboxipeptidasas), así como algunas proteínas homólogas a peptidasas presentes en otras BAL (por ejemplo di y tripeptidasas, endopeptidasas glicoproteicas) (Hols et al., 2005).

Bacteriófagos

Generalidades

Los bacteriófagos (virus que infectan bacterias) pueden encontrarse en todos los hábitats del mundo donde exista proliferación de bacterias. Se estima que son la entidad biológica más ampliamente distribuida en la biosfera, con una población estimada de 10^{31} partículas virales (Hendrix, 2003). Los *Caudovirales* (fagos con cola y ADN doble hebra) representan el 95% de la población de fagos del planeta. Sin embargo existen otros tipos de fagos con genomas y morfologías diferentes a los *Caudovirales*, detallados en la Tabla 2.

Tabla 2: clasificación según el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV)

Orden	Familia	Morfología	Genoma
<i>Caudovirales</i>	<i>Myoviridae</i> *	No envueltos, cola contráctil	dsADN, linear
	<i>Siphoviridae</i> *	No envueltos, cola no contráctil	dsADN, linear
	<i>Podoviridae</i> *	No envueltos, cola corta no contráctil	dsADN, linear
Sin orden asignado	<i>Tectiviridae</i>	No envueltos, isométricos	dsADN, linear
	<i>Corticoviridae</i>	No envueltos, isométricos	dsADN, circular
	<i>Lipothrixviridae</i>	Envueltos, forma de bastón	dsADN, linear
	<i>Plasmaviridae</i>	Envueltos, pleomorfos	dsADN, circular
	<i>Rudiviridae</i>	No envueltos, forma de bastón	dsADN, linear
	<i>Fuselloviridae</i>	No envueltos, con forma de limón	dsADN, circular
	<i>Inoviridae</i>	No envueltos, filamentosos	ssADN, circular
	<i>Micoviridae</i>	No envueltos, isométricos	ssADN, circular
	<i>Leviviridae</i>	No envueltos, isométricos	ssARN, lineal
	<i>Cystoviridae</i>	Envueltos, esféricos	dsARN, segmentado

* Fagos con cola

Los bacteriófagos ejercen una gran influencia en las poblaciones microbianas, afectando la biodiversidad, distribución de especies, la transferencia de material genético e impactando en forma general en las redes tróficas de diferentes ecosistemas (Mc Grath et al., 2007).

Estructura de los *Caudovirales*

Las partículas virales consisten de una cabeza con simetría cúbica y una cola helicoidal con simetría binaria (Lwoff et al., 1962). Este tipo de estructura compuesta por un cabeza y una cola es prácticamente única en virología. Esta característica y varias propiedades fisiológicas y morfológicas indican que los fagos con cola constituyen un grupo monofilético. Al mismo tiempo, este grupo presenta una gran diversidad genética, fisiológica y estructural.

Los viriones carecen de envoltura y están compuestos básicamente por ADN y proteínas. Las cabezas son icosaédricas o derivados icosaédricos elongados. Las colas son helicoidales o consisten en discos apilados, y en la mayoría de los casos presentan estructuras de fijación como fibras, espículas, etc. Todas las proteínas son sintetizadas de forma independiente y luego ensambladas para formar la cápside viral (Calendar et al., 2005).

El genoma de estos virus está compuesto por una única molécula de ADN de doble hebra lineal cuya composición refleja generalmente, la composición del genoma del hospedero (contenido GC, uso de codones, etc.). Una característica común es el agrupamiento de genes con funciones similares generando estructuras bien definidas o módulos. La expresión de estos módulos o conjuntos de genes no es simultánea. En el transcurso de la infección, diferentes genes se irán expresando conforme al punto en el que se encuentre el ciclo, por lo que se definen los genes como tempranos o tardíos (Madigan et al., 2004).

Los distintos géneros dentro del orden *Caudovirales* se diferencian por su estructura genómica (presencia o ausencia de sitios *cos* o *pac*, redundancias terminales y permutaciones circulares), presencia de genes codificantes para ADN o ARN polimerasas, ausencia o presencia de nucleótidos raros y secuencia de ADN (Calendar et al., 2005).

Ciclo de vida básico de un fago

El ciclo vital de un fago puede reducirse a tres etapas: adsorción, infección y liberación. La adsorción puede dividirse en varias etapas: 1-“búsqueda” por difusión pasiva, 2-colisión entre fago y bacteria, 3-adhesión entre fago y bacteria y 4-inyección del genoma viral dentro del hospedador (Calendar et al., 2005). Esta etapa está definida en primera instancia por la interacción entre una proteína viral capaz de reconocer de manera específica a su hospedero (antirreceptor viral) y su contraparte bacteriano o receptor. Los fagos se unen a la bacteria mediante la cola, donde pueden encontrarse estructuras específicas para ayudar en este proceso como espículas o la placa basal. Algunos fagos requieren para que se de esta interacción la presencia de cationes divalentes en el medio, como Ca^{++} o Mg^{++}

(Binetti et al., 2002). Una vez anclado el fago a la superficie bacteriana, este procede a inyectar su genoma al interior celular

La infección puede dividirse en un período eclipse el cual puede extenderse durante un período variable (por ejemplo durante el ciclo lisogénico, este período puede prolongarse indefinidamente) y un período de maduración de la progenie (Calendar et al., 2005). Luego de inyectado el genoma viral dentro del hospedero comienza el proceso de expresión de las proteínas virales y replicación, con la consecuente detención de la actividad metabólica de la bacteria y degradación del genoma hospedero. La expresión de las proteínas se da en un orden preciso, comenzando por los genes tempranos y seguidas por proteínas estructurales y aquellas involucradas en el ensamblaje de los viriones y liberación de la progenie (genes tardíos) (Zinno, 2008). La replicación del genoma comienza luego de que los genes tempranos se han expresado y se da mediante la producción de una única molécula de ADN doble hebra que contiene múltiples copias del genoma viral, el cual luego es procesado para dar múltiples copias individuales. En el caso de los virus lisogénicos, luego de inyectado el genoma viral al interior celular se expresan una serie de proteínas tempranas que inducen la integración del genoma del fago en el cromosoma bacteriano. En el caso del fago Lambda, una integrasa viral guía la integración en un sitio específico del cromosoma de *E. coli* entre los operones *gal* y *bio* (Madigan et al., 2004). El mantenimiento del profago (genoma viral en el cromosoma bacteriano) está mediado por proteínas represoras propias del virus. Por ejemplo, en el caso del fago Lambda, la proteína *cI* reprime la expresión de todas las proteínas del profago, evitando que este se libere y se expresen las proteínas tardías involucradas en el ensamblaje de nuevos viriones y liberación por lisis. La expresión del gen que codifica para *RecA* como consecuencia de la activación del sistema SOS bacteriano (frente a señales de daño), genera que se degrade *cI* y por lo tanto el profago se libere y continúe su ciclo vital como virus lítico (Madigan et al., 2004).

El paso siguiente a la replicación del genoma y expresión de las proteínas estructurales, es el empaquetamiento del ADN. Éste está mediado por enzimas llamadas terminasas y existen dos mecanismos diferentes de procesamiento del ADN con múltiples copias del genoma fágico (concatémero) que permite dividir a los bacteriófagos en dos grupos: los fagos tipo *cos* y los fagos tipo *pac*.

Los fagos tipo *cos* poseen secuencias específicas reconocibles por la terminasa. Estas secuencias se encuentran flanqueando cada copia del genoma del fago. La terminasa reconocerá una secuencia *cos* y se unirá al ADN cortándolo y generando un extremo cohesivo por donde comenzará el empaquetamiento. Luego reconocerá la siguiente secuencia *cos* en el concatémero y realizará la misma acción, por lo que una copia completa del genoma viral comprendida entre esos sitios *cos* se habrá empaquetado (Hernández Magadán, 2007).

En el caso de los fagos tipo *pac*, la terminasa comienza el empaquetamiento reconociendo una secuencia específica llamada sitio *pac*. Luego, ésta comienza a introducir el concatémero al interior de la procápside hasta que se encuentra llena, produciéndose un corte inespecífico en la secuencia de ADN. Este corte genera un extremo cohesivo por el que comienza la siguiente ronda de empaquetamiento. El ADN ingresará a la procápside hasta llenarse, produciéndose un nuevo corte inespecífico y así sucesivamente. La capacidad de almacenamiento de la cápside es un poco mayor que el tamaño real del genoma del fago, por lo que se generan extremos repetidos en el genoma empaquetado. A este fenómeno se lo conoce como redundancia terminal. Otra consecuencia de este mecanismo de empaquetamiento es que diferentes viriones de la misma progenie posean secuencias diferentes en los extremos de sus genomas, fenómeno conocido como permutación circular (Hernández Magadán, 2007).

Por último, luego que el ADN ha sido empaquetado y los viriones ensamblados, ocurre la liberación. Ésta puede ocurrir por varios mecanismos dependiendo del tipo de fago, incluyendo lisis, extrusión o gemación. La lisis por lo general depende de enzimas codificadas por el propio fago (lisinas y holinas) las cuales se encargarán de degradar tanto la membrana como la pared celular, liberando los viriones al ambiente (Calendar et al., 2005).

Genómica

Los *Caudovirales* son probablemente el grupo evolutivamente más dinámico de la biosfera. Estudios de genómica comparativa de varios genomas secuenciados han revelado pistas sobre el mecanismo de evolución de los fagos y han aportado evidencias sobre la importancia de fenómenos de recombinación no homóloga o ilegítima entre diferentes genomas como fuente de generación de diversidad, y eventos de recombinación homóloga como mecanismo de reordenamiento de secuencias (Mc Grath & van Sinderen, 2007).

La recombinación ilegítima es un proceso mediante el cual existe un intercambio de material genético entre secuencias que no comparten similitud. Este mecanismo aporta una gran variabilidad, ya que mediante estos nuevos reordenamientos los fagos son capaces de adquirir genes nuevos e incluso formar nuevos dominios proteicos inexistentes previamente en la naturaleza. Este mecanismo de variación presenta como principal inconveniente el tratarse de un fenómeno esencialmente destructivo. Esto es debido a que los eventos de recombinación ilegítima pueden producir mucho ADN basura, e incluso, pueden conducir a la pérdida de funciones esenciales para el ciclo viral (Hatfull, 2010).

Todos los genomas de *Caudovirales* secuenciados hasta el momento poseen una naturaleza modular. Un genoma con estructura en mosaico se puede definir como

una secuencia formada por varios fragmentos o módulos genéticos definidos, que pueden estar compuestos por un gen o grupo de genes, capaces de moverse libremente en la población, conformando un enorme *pool* de genes (Hendrix, 2003). Una alta frecuencia en eventos de transferencia horizontal de genes es la causa principal de esta estructura en mosaico. Los eventos de recombinación (ilegítima u homóloga) entre fagos virulentos pueden ocurrir entre fagos que infecten simultáneamente al mismo huésped o con elementos genéticos propios de la bacteria. Esto también se cumple para fagos temperados, los cuales pueden recombinar también con otros profagos presentes en el genoma bacteriano (McGrath et al., 2007).

Fagos de *Streptococcus thermophilus*

Todos los fagos de *S. thermophilus* son miembros de la familia *Siphoviridae*, orden *Caudovirales*, caracterizados por cabezas isométricas y colas largas no contráctiles. Las cápsides de los fagos son generalmente de alrededor de 60nm de diámetro, y sus colas oscilan entre 220 y 330 nm (Quiberoni et al., 2010) (Figura 10).

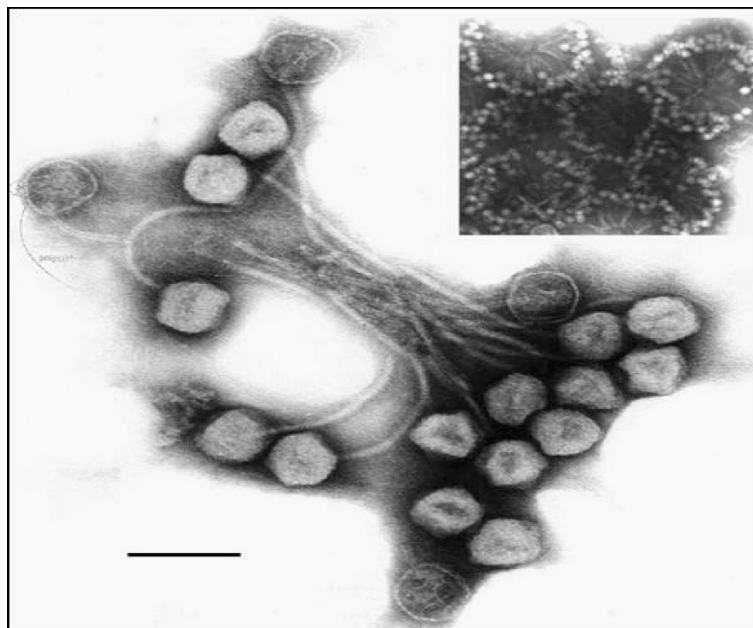


Figura 10: microfotografía electrónica de transmisión de fagos de *S. thermophilus* (Quiberoni, Moineau, Rousseau, Reinheimer, & Ackermann, 2010).

Los fagos de *S. thermophilus* pueden clasificarse en 2 grupos de acuerdo al mecanismo de empaquetamiento de ADN (*cos* o *pac*) y su número de proteínas estructurales mayores. Existe una correlación estricta entre la presencia de un set de proteínas estructurales mayores y el mecanismo de empaquetamiento de ADN. Los fagos *cos* poseen dos proteínas estructurales mayores, mientras que los *pac* poseen tres proteínas estructurales visualizables en un perfil de electroforesis en

SDS-PAGE (Hernández Magadán, 2007).

Las características únicas de los fagos de *S. thermophilus* (resistencia térmica, velocidad de replicación) restringen el desarrollo de estrategias para reducir las infecciones fágicas en ambientes industriales (Reinheimer & Zalazar, 2010). Fagos con estas características pueden causar el fracaso de cultivos iniciadores, incluso si están presentes en bajo número al principio de la fermentación. Además, los fagos pueden permanecer en el aire por largos períodos, lo que implica que la formación de aerosoles sería uno de los principales mecanismos de dispersión de partículas fágicas. Todos estos factores contribuyen al problema de la dispersión de fagos dentro del ambiente industrial (Quiberoni et al., 2010).

Los fagos de *S. thermophilus* son hospedero-específicos. Fagos de diferentes países tienen rangos de hospederos diferentes y generalmente son incapaces de replicarse en cepas de *S. thermophilus* de otras regiones. No se ha reportado una correlación entre homología de ADN y rango de hospedero. Es importante mencionar que no se conoce ningún receptor específico en la superficie celular de *S. thermophilus*.

Los fagos de *S. thermophilus* poseen genomas de ADN de doble hebra de entre 29 y 43 kpb. Hasta el año 2010 habían sido secuenciado un total de 11 genomas fágicos completos que comprenden ambos tipos (*cos* y *pac*). Análisis genómicos mostraron que todos los fagos poseen una organización genómica similar, identificándose diferentes regiones modulares, siendo las más conservadas los módulos de replicación del ADN y el que comprende los genes involucrados en la lisis celular (Figura 11).

Un genoma *core* se define como un set de genes invariablemente presentes y conservados en un grupo de aislamientos. Se individualizó un genoma *core* para los 11 fagos secuenciados. Este resultó ser pequeño y comprende cuatro ORFs (para los fagos O1205, Sfi11, Sfi19, Sfi21, 7201 y Abc2) o cinco ORFs (fagos 858, 2972, ALQ13.2 y DT1). El quinto ORF es un gen de endolisina duplicado. Usando al fago DT1 como modelo, los genes del genoma *core* son: ORF21 (función desconocida), ORF25 (endolisina), ORF27 (endolisina), ORF42 (probable proteína de unión al ADN) y el ORF44 (función desconocida) (Quiberoni et al., 2010).

También se han establecido los genomas *core* para los fagos tipo *cos* y tipo *pac* por separado. El genoma *core* de los fagos *cos* comprende 26 ORFs (fagos 7201, Sfi19 y Sfi21) o 27 ORFs (fagos DT1 y Abc2). El genoma *core* de los fagos *pac* comprende 24 ORFs (fagos O1205 y Sfi11), 25 ORFs (fago ALQ13.2) o 26 ORFs (fagos 2972 y 858).

En conclusión, solo unos pocos ORFs están conservados en todos los fagos de *S. thermophilus*, si bien tanto los fagos *cos* como los fagos *pac* comparten una gran cantidad de genes (Quiberoni et al., 2010).

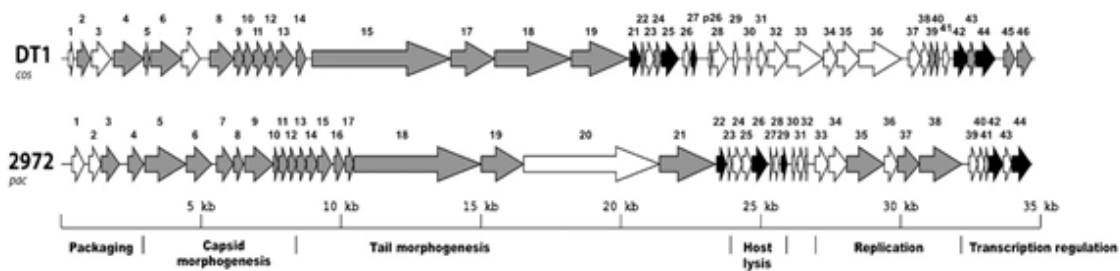


Figura 11: representación de los genomas de dos fagos de *S. thermophilus*. Puede distinguirse en la imagen la agrupación modular de los genes (Quiberoni et al., 2010).

Problemas a nivel industrial

Los ataques fágicos son hoy en día la causa más común de fermentaciones lentas o incompletas a nivel industrial. Contaminación con fagos virulentos puede resultar en la lisis de los cultivos iniciadores en la tina de fermentación, causando fermentaciones lentas o incluso la falla total del proceso, con la consecuente pérdida de la producción (Bruttin et al., 1997).

En general, los fagos de *Streptococcus thermophilus* aislados de plantas de elaboración de queso muestran mayor diversidad que aquellos derivados de elaboraciones de yogurt. Una explicación para esto radica en las diferencias de iniciadores y condiciones de fermentación. Debido a que la propagación fágica es dependiente de la presencia de hospedadores adecuados y en las elaboraciones de yogurt se emplea un pequeño número de iniciadores bien definidos, solo puede esperarse una gran variedad de fagos en las elaboraciones queseras, donde se usan principalmente fermentos complejos o mayor diversidad de estos. Además, debido a las diferentes condiciones de tratamientos térmicos y diseños de planta y procesos (tinas de fermentación cerradas versus abiertas), las plantas de elaboración de yogurt son menos susceptibles que las queserías a la invasión por fagos provenientes de fuentes ambientales. El proceso más crítico en las elaboraciones queseras es la separación del suero, que inevitablemente origina aerosoles (que pueden contener partículas fágicas) en la planta (Reinheimer et al., 2010).

Con el objetivo de determinar si la diversidad en la población fágica surge del ambiente o de cambios genéticos en los bacteriófagos residentes, Bruttin y colaboradores en 1997 llevaron a cabo un control a lo largo del tiempo en una planta quesera. Se eligió una planta elaboradora de mozzarella que empleaba fermento natural complejo, en tanques abiertos de fermentación continua. Tal planta sería muy susceptible a la invasión por bacteriófagos del ambiente. Si un fago invadiera la planta y experimentase cambios genéticos, se podría predecir una familia de bacteriófagos estrechamente relacionados, con similares perfiles de restricción y uno o varios hospedadores coincidentes. Además se esperaría una

acumulación de mutaciones puntuales, deleciones y recombinaciones como consecuencia de una rápida evolución fágica, y cambios en los perfiles de restricción durante el monitoreo. Alternativamente, si la diversidad hubiera ocurrido antes de la entrada a la planta, se podrían predecir variados espectros de hospedadores y perfiles de restricción. Los bacteriófagos serían genéticamente diferentes.

Las observaciones realizadas durante el período de control de dos años, no aportó evidencias significativas que apoyaran el modelo de una única invasión y posterior diversificación de los fagos.

Posteriormente se realizó un estudio de “intervención”, que consistió en sustituir el cultivo iniciador definido utilizado hasta ese momento por uno complejo, compuesto de células resistentes a la población fágica previamente determinada en la planta. Esa intervención provocó un marcado descenso en los niveles de bacteriófagos y una rápida colonización por nuevos fagos que se rastrearon hasta la leche cruda. Los únicos cuatro nuevos fagos aislados exhibieron perfiles de restricción diferentes. Análisis posteriores permitieron establecer que éstos no eran derivados de la población fágica antigua. Sin embargo, eran idénticos a aquellos aislados en bajas concentraciones a partir de leche cruda recibida en planta durante el estudio. Teóricamente, el estudio de intervención provocaría una fuerte presión hasta que los fagos residentes fueran capaces de mutar a un nuevo rango de hospedadores. Sin embargo, la población de fagos residentes no fue eliminada hasta 10 días después del uso de fermentos no susceptibles. La reintroducción de cepas susceptibles permitió una rápida reaparición de los fagos residentes indicando que pueden mantenerse en la planta por al menos tres semanas en ausencia de sus cepas hospedadoras en el cultivo iniciador.

En conclusión, los datos de estos estudios identificaron a la leche cruda como la fuente de fagos que contaminan las plantas de elaboración de queso. No fue posible encontrar evidencias de cambios genéticos en los fagos de la planta. La ausencia de recombinación parece sorprendente en vista de las experiencias de laboratorio que reportan frecuentes recombinaciones entre fagos después de sucesivas infecciones del cultivo iniciador. Esto puede deberse a la ausencia de hospedadores coincidentes, resultando en una clase de aislamiento reproductivo que podría ser muy importante en el diseño del cultivo iniciador. Aparentemente, toda la diversidad genética observada en los fagos de *Streptococcus thermophilus* durante el estudio ya estaba presente en el ambiente de la planta y refleja la ecología natural y no la evolución durante la residencia en ella. Por lo tanto, un conocimiento detallado de la diversidad genética de los fagos de *Streptococcus thermophilus* y sus hospedadores dentro del ambiente natural es esencial para el éxito de cualquier medida de control que desee implementarse en plantas queseras (Bruttin et al., 1997).

El sistema inmune bacteriano CRISPR

Generalidades

Bacterias y arqueobacterias adquieren resistencia a elementos genéticos extraños (fagos y plásmidos) mediante la incorporación de fragmentos de ADN exógeno a sus genomas en un extremo de un elemento repetitivo llamado CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*). La inmunidad adquirida mediada por CRISPR se da en tres etapas diferentes: adquisición de ADN exógeno, biogénesis de CRISPR ARNs o crARNs y por último la etapa de interferencia. A pesar de que estas tres etapas básicas parecen ser comunes a todos los sistemas CRISPR, los *loci* CRISPR y las proteínas efectoras de cada etapa presentan una gran diversidad.

Diseño de las secuencias CRISPR

Las secuencias CRISPR son una diversa familia de elementos genéticos que comparten una arquitectura similar. Cada *locus* CRISPR está compuesto por una serie de secuencias cortas repetidas (típicamente entre 20 y 50pb) separadas entre si por una única secuencia espaciadora de longitud similar (Kunin et al., 2007). Las secuencias repetidas dentro de un mismo *locus* son conservadas, pero diferentes *loci* pueden presentar diferencias a nivel tanto de longitud como de secuencia. Algunos de estos repetidos son palindrómicos y forman ARNs con estructuras en horquilla estables, mientras que otros no forman estructuras. A pesar de la gran diversidad de secuencias de repetidos, la mayoría poseen un motivo 3'conservado GAAA(G/C) el cual se presume sirve como sitio de unión para una o más proteínas Cas conservadas (Kunin et al., 2007).

Además de la diversidad en la secuencias espaciadoras y de los repetidos, el número de *loci* CRISPR presentes en un organismo y el largo de los mismos es variable. El número y tamaño de los *loci* CRISPR presentes en un genoma, tampoco se correlacionan con el tamaño del mismo.

Una secuencia rica en AT llamada líder puede encontrarse generalmente en un extremo del *locus*. Análisis comparativos han demostrado que las secuencias espaciadoras que se encuentran más cerca de la secuencia líder son más diversas mientras que las que se encuentran más alejadas tienden a ser degeneradas (Pourcel et al., 2005). Estas observaciones indican que existe una polaridad, siendo el extremo líder por donde se incorporan nuevos elementos. Es más, la secuencia líder posee elementos promotores (Hale et al., 2012) y sitios de unión para proteínas reguladoras esenciales para la expresión de crARNs y la adquisición de nuevos espaciadores (Yosef et al., 2012).

Proteínas asociadas y clasificación.

Además de la secuencia líder, análisis comparativos han identificado un casete variable de genes llamados genes asociados *cas* (*CRISPR-associated*), usualmente localizados adyacentes al *locus* CRISPR. Cuatro genes *cas* fueron identificados en un principio (Jansen et al., 2002) aunque actualmente se conocen más de 45 familias de genes diferentes comúnmente asociados a *locus* CRISPR (Haft et al., 2005). Seis de estos (*cas1-cas6*) se encuentran muy conservados y se consideran como los genes *core*, aunque únicamente *cas1* y *cas2* se encuentran universalmente distribuidos entre todos los organismos que poseen *loci* CRISPR. *cas1* es el gen marcador de este sistema inmune, y análisis filogenéticos usando secuencias de *cas1* sugieren que existen diferentes versiones del sistema CRISPR. Cada uno de estos filotipos está definido por una composición única y ordenamiento característico de genes *cas* (Figura 12). Ésta clasificación se correlaciona con análisis filogenéticos realizados con secuencias de repetidos, lo que sugiere que las proteínas Cas interaccionan de manera específica con determinados *loci* CRISPR (Kunin et al., 2007).

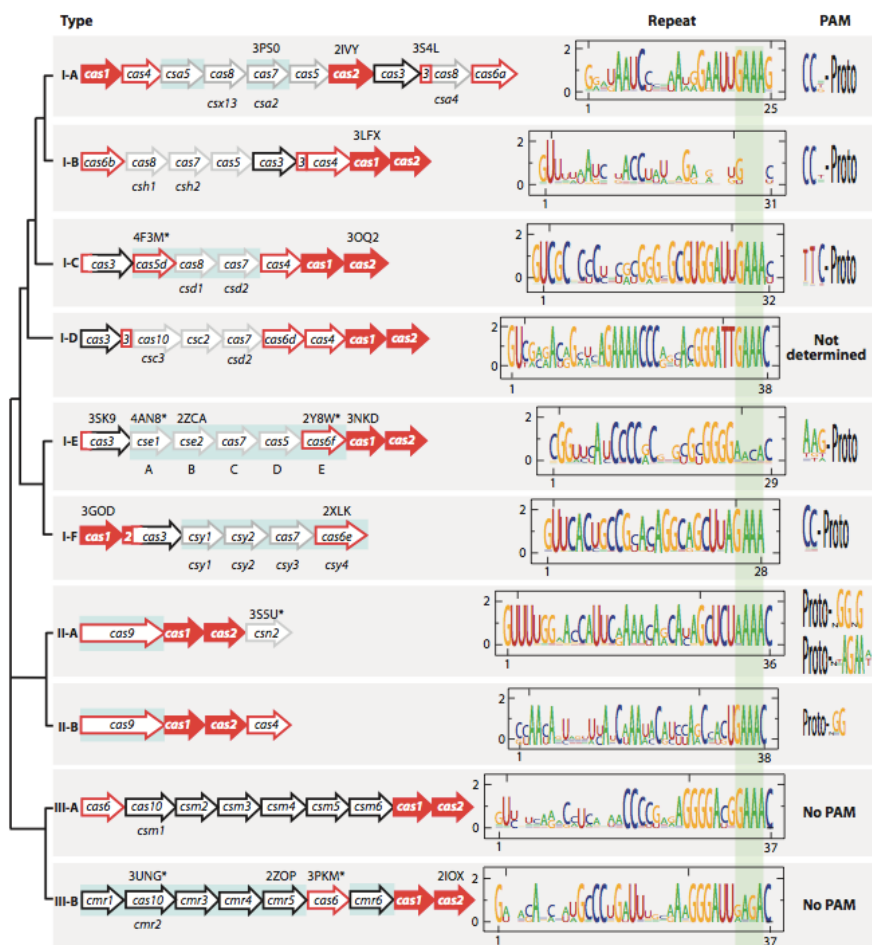


Figura 12: Diferentes tipos y subtipos de sistemas CRISPR. Puede observarse en la figura las distintas organizaciones de genes *cas* y las secuencias espaciadoras (Sorek et al., 2013).

Existen tres grandes tipos de sistema CRISPR, llamados I, II y III, los cuales a su vez se subdividen en diferentes subtipos. Estos tres tipos poseen dos genes universales: *cas1*, el cual codifica una DNasa sin especificidad de secuencia, la cual podría estar involucrada en la incorporación de nuevos espaciadores al sistema (Marraffini et al., 2009) y *cas2*, el cual codifica una endorribonucleasa metal-dependiente (Beloglazova et al., 2008). Sin embargo, los tres tipos de sistema difieren substancialmente en el resto de los genes que los componen, y cada uno se caracteriza por poseer un gen marcador único. Los genes marcadores para los tres tipos son respectivamente: *cas3* (una helicasa de la superfamilia 2, con un dominio nucleasa N-terminal) *cas9* (una proteína de gran tamaño con un dominio RuvC-like y un dominio HNH nucleasa), y *cas10* (una proteína que contiene un dominio homólogo al dominio “palma” de las ADN polimerasas) (Kira et al., 2011).

Etapas de la inmunidad

El mecanismo de protección mediado por CRISPR, puede dividirse en tres etapas: adaptación (adquisición de nuevos espaciadores), biogénesis de crARNs e interferencia (Figura 13).

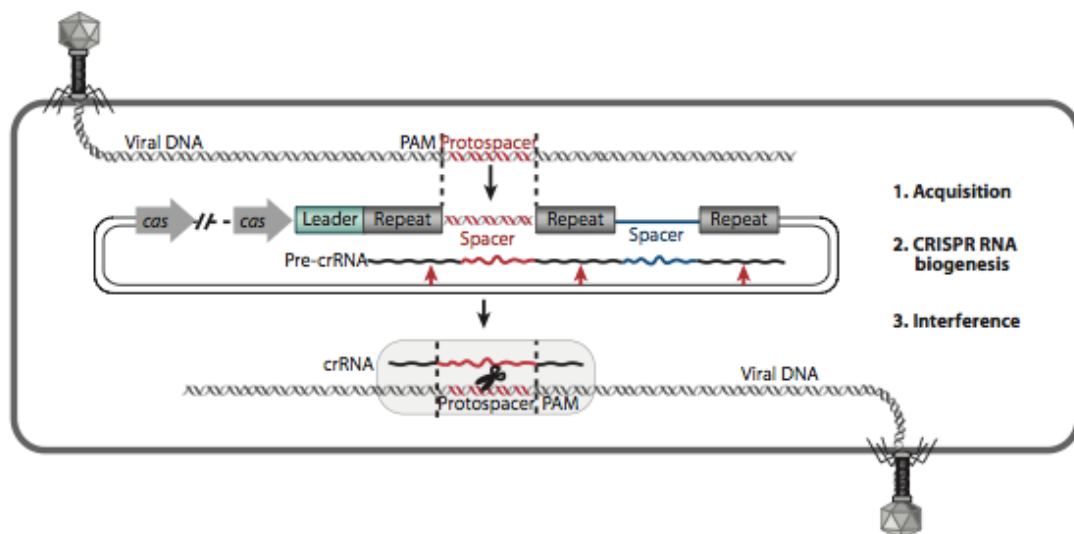


Figura 13: Representación esquemática de las etapas de la inmunidad mediada por CRISPR (Sorek et al., 2013).

1. Adaptación

Pourcel y colaboradores en 2005, reportaron que los *loci* CRISPR de *Yersinia pestis* evolucionan mediante la adición polarizada de nuevos espaciadores provenientes de secuencias fágicas, y que la adición de estos nuevos espaciadores va acompañada por la duplicación del repetido más próximo a la secuencia líder (Pourcel et al., 2005). Asimismo, se ha demostrado (Bolotin et al., 2005) que la

sensibilidad a los ataques fágicos en *S. thermophilus* se correlaciona con la cantidad de secuencias espaciadoras en los *loci* CRISPR homólogos a estos virus.

También se observó que polimorfismos de una base entre la secuencia espaciadora y su homólogo en el genoma viral (llamada secuencia proto-espaciadora) elimina el efecto protector del mismo (Barrangou et al., 2007).

La adición iterativa de nuevos espaciadores puede aumentar el repertorio defensivo del organismo. Sin embargo estos *loci* no pueden crecer infinitamente. Se ha observado que pueden ocurrir deleciones usualmente en el extremo opuesto al de la secuencia líder, lo que implicaría que el sistema está adaptado para deshacerse de los espaciadores más antiguos y probablemente inútiles mientras que conserva los más nuevos ubicados en el extremo líder (Deveau et al., 2008).

La maquinaria del sistema aparentemente reconoce secuencias específicas para su integración al *locus* CRISPR. Las secuencias de ADN foráneo seleccionadas para su integración, los proto-espaciadores, se encuentran generalmente flanqueadas por un pequeño motivo llamado PAM. La importancia del PAM va más allá de la adquisición de nuevos espaciadores, ya que una sola mutación en este motivo por parte del virus (o plásmido) elimina el efecto protector brindado por el espaciador.

2. Biogénesis de crARNs

La maduración del crARN es crítica para la activación del sistema, e involucra al menos dos etapas. Los *loci* CRISPR inicialmente se transcriben formando largos precursores (pre-crARNs) desde un promotor en la secuencia líder (Sorek et al., 2013). Cada tipo de sistema posee un mecanismo de maduración diferente. El mecanismo de maduración en los sistemas tipo II, tipo de sistema activo en *S. thermophilus*, se explica más adelante.

3. Interferencia

El reconocimiento de secuencias objetivo por parte del sistema CRISPR involucra la hibridación entre el crARN y su homólogo en la secuencia de ADN invasora. Esto representa un problema potencial para los sistemas que atacan dsADN (tipo I y II) o para los que atacan ARN (tipo III) ya que las estructuras secundarias formadas por el ARN pueden dificultar el proceso (Sorek et al., 2013).

El complejo de reconocimiento guiado por crARNs en *E. coli* llamado *Cascade*, se une preferentemente a fragmentos de dsADN largos (plásmidos o fagos) que estén negativamente superenrollados. El superenrollamiento negativo introduce tensión torsional la cual facilita la separación de las hebras. Aproximadamente la mitad de la energía necesaria para separar 32pb (90 kJ/mol) es provista por esta tensión, lo que facilita enormemente el reconocimiento mediado por crARNs (Westra et al., 2012).

Como se mencionó anteriormente, la presencia del motivo PAM es necesaria para la etapa de interferencia, ya que el mismo es identificado por el complejo de reconocimiento como parte del mecanismo que evita la auto destrucción del ADN del hospedero.

Las proteínas involucradas y el mecanismo de degradación del ADN invasor es diferente para cada tipo de sistema. (Sorek et al., 2013) En los sistemas de tipo II, únicamente la proteína Cas9 es necesaria para llevar a cabo este proceso. Cas9 es guiada por el crARN y realiza un único corte en las dos hebras en la secuencia del proto-espaciador, generando un extremo romo. Este corte es suficiente para proveer inmunidad al hospedero contra el ADN invasor (Jinek et al., 2012).

CRISPR en *Streptococcus thermophilus*

En *Streptococcus thermophilus* han sido identificados cuatro *loci* CRISPR, pero únicamente dos de ellos son significativamente activos (capaces de adquirir nuevos espaciadores). Estos dos *loci* activos, llamados CRISPR1 y CRISPR3, pertenecen al subgrupo II-A (Figura 14).

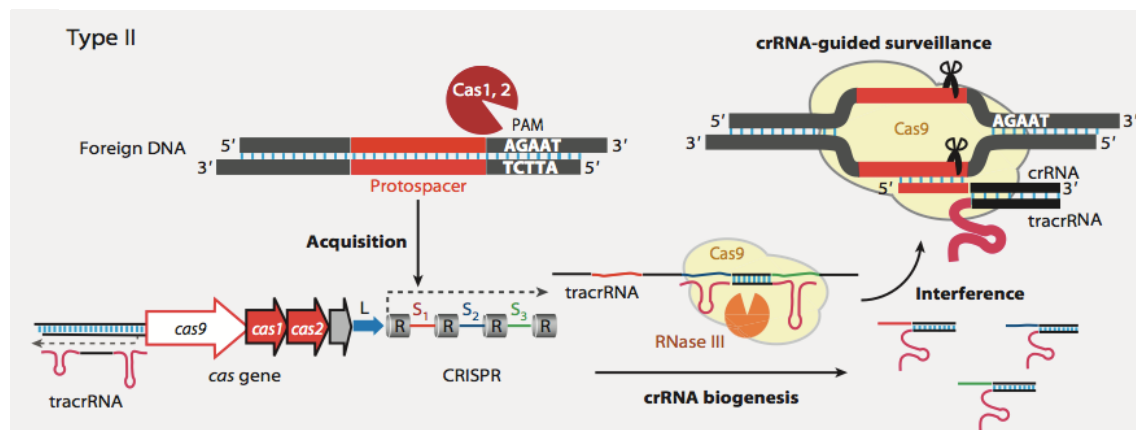


Figura 14: Diferentes etapas del mecanismo de resistencia mediado por un sistema CRISPR de tipo II (Sorek, Lawrence, & Wiedenheft, 2013).

Los sistemas tipo II se han encontrado únicamente en bacterias (Kira et al., 2011). Estos sistemas están constituidos únicamente por cuatro genes: *cas9*, *cas1*, *cas2* *csn2* (subtipo II-A) o *cas4* (subtipo II-B). Como ya se mencionó, el gen marcador de este sistema es *cas9*, el cual codifica una proteína multifuncional de gran tamaño que participa tanto en la biogénesis de crARNs como en la destrucción del ADN invasor (Deltcheva et al., 2011). La biogénesis de los crARNs es única en este tipo de sistema, ya que requiere un segundo ARN trans activante llamado tracrARN. Este tracrARN se encuentra codificado aguas arriba y en la hebra opuesta al *locus* CRISPR (Deltcheva et al., 2011). Dos isoformas del tracrARN son expresadas (89 y 171 nt respectivamente), las cuales contienen un fragmento de 25 nt casi

perfectamente complementario a la secuencia del repetido del *locus*. La hibridación entre este tracrARN y el crARN forma un fragmento dsARN el cual es reconocido y cortado por la RNasa III bacteriana como parte del proceso de maduración. El crARN maduro posee por tanto en su extremo 3' un fragmento de ARN doble hebra el cual es necesario para ser reconocido por Cas9 en la etapa de degradación del ADN invasor (Sorek et al., 2013).

Objetivos y estrategia de trabajo

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es obtener cepas de *Streptococcus thermophilus* resistentes a bacteriófagos autóctonos, con potencial para ser utilizadas como cultivos iniciadores por la industria quesera nacional.

Objetivos específicos

- Obtener técnicas optimizadas para la detección de fagos en muestras industriales
- Crear un banco de fagos autóctonos
- Caracterizar los bacteriófagos aislados
- Evaluar la colección de cepas de *Streptococcus thermophilus* de partida con los fagos aislados (sensibilidad/resistencia)
- Evaluar las características tecnológicas de las cepas iniciadoras industriales de partida y establecimiento de parámetros para la comparación entre las cepas candidatas obtenidas y las cepas madre.
- Obtener cepas de *Streptococcus thermophilus* resistentes a fagos
- Analizar la resistencia adquirida de las nuevas cepas mediante estudio del sistema CRISPR

Estrategia de trabajo

La estrategia planteada para cumplir los objetivos de este trabajo constó de dos grandes partes. Por un lado la creación de un banco de bacteriófagos autóctonos y por otro lado la selección y obtención de cepas resistentes a estos fagos a partir de un banco de cepas de *Streptococcus thermophilus* proporcionadas por la empresa BIOMÁS S.A..

Creación del banco de fagos

La creación del banco de fagos es esencial para conocer la diversidad de fagos presente en el ambiente industrial de nuestro país, y además los fagos aislados junto con las cepas bacterianas de la colección constituyen el material de partida para la generación de resistentes. La mejor fuente para aislar bacteriófagos ha sido el propio ambiente industrial dado que se procesan grandes volúmenes de leche de diferentes orígenes y las concentraciones de microorganismos son mucho mayores que las que se puede encontrar en el ambiente natural. La creación del banco de fagos implicó la realización de varias actividades. En primer lugar, se ajustaron técnicas moleculares (PCR y QPCR) de detección de fagos en muestras industriales (suero y leche). Estas técnicas, permitieron identificar en forma rápida la presencia de fagos en las numerosas muestras analizadas evitando ensayos largos y costosos en recursos y tiempo (como el recuento en placa).

A partir de las muestras positivas, se aislaron los bacteriófagos presentes, por el método de la doble capa de agar, y posterior multiplicación en medio líquido, obteniéndose un banco primario de fagos que fueron preservados en diferentes condiciones (-80°, 4°, etc.).

A fin de reducir el tamaño del banco de fagos se realizó la caracterización de los fagos aislados, descartando aquellos que hubieran sido aislados más de una vez. La caracterización fue llevada a cabo mediante la creación de una matriz sensibilidad/resistencia, utilizando las cepas comerciales de *Streptococcus thermophilus* de nuestra colección y los fagos aislados, y mediante la realización de perfiles de restricción de los genomas virales. Se obtuvo un banco secundario de fagos representativo de la diversidad viral presente en los ambientes industriales nacionales durante el período de tiempo estudiado.

Algunos fagos fueron seleccionados para realizar un análisis genómico completo .

Selección y obtención de resistentes

Las cepas utilizadas como punto de partida fueron diez cepas de *Streptococcus thermophilus* que por un trabajo previo y por información proporcionada por la empresa, poseían las características tecnológicas deseadas, a saber, una curva de acidez adecuada durante la fermentación de lactosa y facilidad de escalado, entre otras.

Nuestro principal objetivo, fue obtener cepas resistentes que se comportaran a nivel de producción igual o mejor que sus cepas madre. Para determinar esto, establecimos, en primer lugar, el perfil de acidificación dentro del cual debían encontrarse las cepas resistentes obtenidas.

A partir de las diez cepas de partida se obtuvieron las cepas resistentes sometiéndolas a un ataque viral (uno o más fagos), y observando la aparición de mutantes espontáneos resistentes. Estos mutantes, se evaluaron por su capacidad acidificante y se seleccionaron aquellos que se comportaban según lo esperado.

A continuación, se evaluaron las cepas resistentes mediante el estudio de los *loci* CRISPRs bacterianos. Para esto se utilizó, como material de partida, los fagos cuyos genomas habían sido secuenciados y las cepas de *S. thermophilus* sensibles a estos. El análisis consistió en la amplificación y secuenciado de los *loci* CRISPRs de las cepas madre y de las cepas resistentes obtenidas a partir de ellas, en busca de nuevos espaciadores. La presencia de nuevos espaciadores (uno o más) es señal de que el mutante es resistente. Luego se analizaron los nuevos espaciadores buscando su ubicación en el genoma viral, a fin de determinar su “calidad”. Dado que los fagos sufren mutaciones con mucha frecuencia, son capaces de eludir la resistencia si el espaciador adquirido por la bacteria tiene su contraparte en una región muy variable del genoma viral. El análisis minucioso de estas secuencias permite identificar cuáles son los mejores candidatos a ser utilizados como iniciadores industriales. Aquellos mutantes con espaciadores adquiridos de las regiones más conservadas del genoma del fago, tienen mayores probabilidades de ser utilizadas por más tiempo, ya que la posibilidad de que aparezca un fago mutante capaz de burlar el sistema defensivo es más reducida.

Materiales y métodos

Material de partida

Cepas bacterianas

Un total de 51 cepas de *Streptococcus thermophilus* fueron utilizadas en este trabajo. La colección de cepas fue suministrada por la empresa distribuidora de fermentos lácticos BIOMÁS S.A.

Bacteriófagos

Los bacteriófagos fueron aislados a partir de muestras provenientes de plantas industriales y potes de fermento. Un total de 432 muestras fueron analizadas, de las cuales 422 fueron recolectadas de plantas de producción de queso nacionales entre los años 2010 y 2012, y 10 corresponden a potes de fermentos provenientes de Argentina proporcionados por la empresa BIOMÁS S.A. En el Anexo 2 se detallan las muestras.

Métodos

Detección de fagos por PCR (método Host)

Objetivo

El objetivo de esta técnica es la detección de fagos en muestras de suero y leche, así como la obtención de amplicones para secuenciar.

Fundamento

En este método se utilizan los cebadores detallados en la Tabla 3, los cuales amplifican una porción del gen VR del antirreceptor viral. Los cebadores fueron obtenidos de la bibliografía (Binetti et al., 2005). El tamaño del amplicón esperado es de aproximadamente 700pb. Utilizando este método no es posible determinar la naturaleza del fago encontrado (*cos* o *pac*), ni tampoco determinar con certeza el número de fagos diferentes en la muestra. Se detalla el procedimiento utilizando el kit *Taq* de Invitrogen.

Protocolo

Mix para una reacción	Ciclo de reacción
5µl 10X PCR buffer	94°C – 3 minutos
1,5µl MgCl2 50mM	94°C – 45 segundos
2,5µl Host1/Host1B 10µM	60°C – 1 minuto
2,5µl Host5 10µM	72°C – 1 minuto
3,2µl dNTPs 10mM	72°C – 7 minutos
0,4µl <i>Taq</i>	25°C – 10 minutos
2µl muestra de suero/leche	Los pasos marcados en negrita se repiten 35 veces
32,9µl agua MQ	
Volumen final de la reacción: 50µl	

Interpretación y observaciones

Los productos de PCR se visualizan mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2% revelados con EtBr. Se ha determinado empíricamente que algunos fagos no es posible detectarlos por este método conduciendo a resultados falsos negativos. Por defecto el cebador de avance a emplear es el Host1, si la amplificación es negativa puede utilizarse el cebador Host1B.

Tabla 3: cebadores utilizado

Cebador	Secuencia	Tm
Host1	5'-GAATGATACTGCTGGCAGTATTTTCGGTTGG-3'	68°C
Host1B	5'-CGAGGAAACGACGGGAAGGATGG-3'	68°C
Host5	5'-CAGTCATGTAGCTATCGATGAAATTCCAACG-3'	68°C

Detección de fagos por PCR (método múltiplex)

Objetivo

El objetivo de esta técnica es la detección de fagos en muestras de suero y leche, así como determinar la presencia de fagos de tipo *cos* y *pac* de forma simultánea

Fundamento

En este método se utilizan los cebadores detallados en la Tabla 4, los cuales amplifican una porción del gen VR del antirreceptor viral (Quiberoni et al., 2006). El tamaño del amplicón esperado es de aproximadamente 100pb para fagos *cos*, y unas 300pb para fagos *pac*. Este método no permite determinar la cantidad total de fagos diferentes en la muestra. Se detalla el procedimiento utilizando el kit *Taq* de Invitrogen.

Protocolo

Mix para una reacción	Ciclo de reacción
5µl 10X PCR buffer	94°C – 3 minutos
1,5µl MgCl ₂ 50mM	94°C – 45 segundos
2,5µl de cada cebador 10µM	54°C – 1 minuto
3,2µl dNTPs 10mM	72°C – 1 minuto
0,5µl <i>Taq</i>	72°C – 5 minutos
2µl muestra de suero/leche	25°C – 10 minutos
27,8µl agua MQ	Los pasos marcados en negrita se repiten 35 veces
Volumen final de reacción: 50µl	

Interpretación y observaciones

Los productos de PCR se visualizan mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2%. El tamaño del amplicón para fagos *cos* tiene un tamaño muy reducido, por lo que es necesario prestar atención al blanco de la reacción, por la aparición de dímeros de cebadores. Cuando aparecen, los dímeros de cebadores se presentan como una banda tenue en la zona de 50-100pb, lo que puede llevar a resultados falsos positivos

Tabla 4: cebadores utilizados

Cebador	Secuencia	T _m
cosFOR	5'-GGTTCACGTGTTTATGAAAAATGG-3'	61°C
cosREV	5'-AGCAGAATCAGCAAGCAAGCTGTT-3'	66°C
pacFOR	5'-GAAGCTATGCGTATGCAAGT-3'	61°C
pacREV	5'-TTAGGGATAAGAGTCAAGTG-3'	60°C

Detección y cuantificación de fagos por qPCR (tecnología SYBR Green)

Objetivo

El objetivo de esta técnica es la detección y cuantificación de bacteriófagos en muestras de suero, leche, agua, etc., y titulación de stocks

Fundamento

La PCR en tiempo real es una variación de la PCR convencional, que permite monitorear ciclo a ciclo la acumulación de producto mediante fluorescencia. La fluorescencia es medida ciclo a ciclo mediante excitación de agentes reveladores y posterior recepción de la emisión de los mismos. El incremento en la fluorescencia en los sistemas utilizados es proporcional a la cantidad de producto en cada ciclo, por tanto es posible monitorear la cinética completa de la reacción. El SYBR Green es un agente intercalante, que se une al ADN doble hebra de forma inespecífica. Este colorante, al ser excitado con luz de longitud de onda azul, fluoresce emitiendo luz de longitud de onda verde (por eso su nombre). Además posee la particularidad de que al unirse al ADN se incrementa notablemente su capacidad de emitir fluorescencia, lo cual lo hace un agente ideal para monitorear la acumulación de producto durante una reacción de PCR. La identificación del producto de amplificación se da mediante la construcción de una curva de *fusión*. El fundamento de esta técnica se basa en que cada amplicón posee una temperatura media de desnaturalización (temperatura a la cual la mitad del ADN doble hebra se encuentra disociado) o T_m, la cual depende del largo de la secuencia y del contenido GC de la misma. La cuantificación es posible gracias a la construcción de curvas estándar a partir de stocks de fagos previamente titulados en placa. Se detalla el procedimiento de detección y cuantificación utilizando el kit Rotor Gene SYBR Green de Qiagen y el equipo Rotor Gene 6000. Las secuencias de cebadores y sondas fueron obtenidas de la literatura (del Rio et al., 2008).

Protocolo

Mix para una reacción	Ciclo de reacción
5µl 10X SYBR Green RotorGene master	95°C – 5 minutos
0,25µl de cada cebador 10µM	95°C – 5 segundos
1µl de muestra	60°C – 10 segundos
3,5µl agua MQ	Los pasos marcados en negrita se repiten 35 veces
Volumen final de la reacción: 10µl	<i>Fusión</i>
	Rampa de 70°C a 90°C con incremento de 0,5°C cada 5 segundo

Interpretación y observaciones

La curva estándar debe construirse usando al menos cuatro diluciones seriadas de un stock puro de concentración conocida por titulación en placa. Una vez construida, la ecuación puede almacenarse como un archivo e importarse cada vez que se hace un ensayo de detección/cuantificación. Para cuantificación en muestras de leche es necesario en todos los casos realizar una dilución al décimo previo a la preparación de la corrida. Para cuantificar en muestras de suero, solo es necesario diluir si la cantidad de sólidos suspendidos es muy grande y no pueden eliminarse por centrifugación. De ser necesario, puede filtrarse la muestra usando filtros de 0,45µm.

Este no es un ensayo tipo multiplex, por tanto deben prepararse mix de reacción separadas para fagos *cos* y *pac*, y los resultados para cada muestra se informan como concentraciones de fagos *cos* y *pac* de forma independiente. El límite de la técnica es de una partícula de fago por cada µl de muestra.

Bajo estas condiciones, se considera positivo un ensayo de detección de fagos *cos* cuando el pico de *fusión* es de 77°C ± 1°C, y positivo para fagos *pac* cuando el pico de *fusión* es de 81°C ± 1°C.

Tabla 5: cebadores utilizados

Cebador	Secuencia	Tm
qcos1	5'-TGCCATATCATGTTGAGATAAGGAC-3'	62°C
qcos2	5'-TGCATCAACAATTTTATCGCCTTG-3'	62°C
qpac1	5'-CGGGTGCTGGTTTCAATCA-3'	64°C
qpac2	5'-CTGCTGAGTTATACACTAATCGAACC-3'	63°C

Detección y cuantificación de fagos por qPCR (tecnología *Taqman*)

Objetivo

El objetivo de esta técnica es la detección y cuantificación de bacteriófagos en muestras de suero, leche, agua, etc., y titulación de stocks

Fundamento

El fundamento de esta técnica es similar a la descrita anteriormente, pero la diferencia es que en lugar de utilizar un agente intercalante fluorescente, se utiliza una sonda marcada con un fluoróforo y un *quencher*. Al ser la sonda degradada por la polimerasa durante la amplificación, el efecto inhibitorio del *quencher* sobre el fluoróforo es eliminado, permitiendo que este emita luz captable por el equipo. Se detalla el procedimiento de detección y cuantificación utilizando el kit Rotor Gene Probe de Qiagen y el equipo Rotor Gene 6000. Las secuencias de cebadores y sondas fueron obtenidas de la literatura (del Rio et al., 2008).

Protocolo

Mix para una reacción	Ciclo de reacción
5µl 10X RotorGene Probe master mix	95°C – 5 minutos
0,5µl de cada cebador 10µM	95°C – 5 segundos
0,5µl de sonda 10mM	53°C – 10 segundos
1µl de muestra	Los pasos marcados en negrita se repiten 40 veces
2,5µl de agua MQ	
Volumen final de la reacción: 10µl	

Interpretación y observaciones

La curva estándar debe construirse usando al menos cuatro diluciones seriadas de un stock puro de concentración conocida por titulación en placa. Una vez construida, la ecuación puede almacenarse como un archivo e importarse cada vez que se hace un ensayo de detección/cuantificación. La adquisición de fluorescencia debe hacerse por los canales verdes y amarillo, para que pueda detectarse la fluorescencia emitida por los dos fluoróforos diferentes de las sondas. Este protocolo puede ajustarse para realizar reacciones tipo multiplex (detección simultánea de fagos *cos* y *pac* en el mismo tubo).

Tabla 6: cebadores utilizados

Cebador	Secuencia	T _m
qcos1	5'-TGCCATATCATGTTGAGATAAGGAC-3'	62°C
qcos2	5'-TGCATCAACAATTTTATCGCCTTG-3'	62°C
qpac1	5'-CGGGTGCTGGTTTCAATCA-3'	64°C
qpac2	5'-CTGCTGAGTTATACACTAATCGAACC-3'	63°C

Tabla 7: sondas utilizadas

Sonda	Secuencia	T _m
qCOSp	5'FAM-TTGGTCGTTCTACTGTTAA-3'BHQ1	55°C
qPACp	5'HEX-ACATGGCTGCATCTCT-3'BHQ1	58°C

Aislamiento de bacteriófagos en placa - ensayos en doble capa de agar DCA

Objetivo

El objetivo de este ensayo es aislar y obtener una población clonal de un bacteriófago a partir de cualquier muestra

Fundamento

Este ensayo es esencialmente similar a los ensayos de recuento en placa de bacterias, pero al final del proceso en lugar de contar colonias, se recuperan las placas de lisis aisladas y se liberan los fagos del agar a un medio acuoso. Todos los fagos recuperados de una única placa de lisis son la progenie de un único fago, por lo tanto obtenemos una población clonal. Los lisados recuperados pueden multiplicarse hasta generar stocks de alto título.

Protocolo

1. Tomar una muestra de leche y añadir ácido láctico hasta alcanzar un pH de 4,5 (si la muestra es de suero comenzar en el paso 2)
2. Centrifugar durante 15 minutos a 6000 rpm
3. Recuperar el sobrenadante y filtrarlo con un filtro de 0,45µm (se obtiene un filtrado libre de contaminantes o FLC)
4. Realizar diluciones seriadas 1:10 del FLC en MgSO₄ 10Mm (al menos 6)

5. Tomar 0,1ml de cada dilución del FLC e incubar en mesada durante 15 minutos con 0,1ml de cultivo de *S. thermophilus* fresco (hacer esto con todas las diluciones del FLC)
6. Transferir el cultivo incubado a un tubo con 5ml de LM17 CaCl₂ 10mM-Agar 0,7% termostatzado a 45°C. Mezclar con vortex por 5 segundos
7. Transferir el contenido del tubo a una placa de LM17 CaCl₂ 10mM. Agitar suavemente hasta que se cubra toda la superficie de la placa
8. Dejar secar en mesada durante 5 minutos, luego invertir la placa y dejar secar durante 10 minutos
9. Incubar a 37°C durante la noche
10. Con un *tip* cortado, retirar una playa aislada y liberar en un *eppendorf* con 0,3ml de buffer SM
11. Agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, o dejar a 4°C durante 24 horas para que las partículas fágicas se liberen del agar.

Interpretación y observaciones

El número de diluciones se estima intentando obtener una placa con playas contables, aunque no hay garantías previas de que no vayamos a ver lisis total en todas las placas. Si se realizó una titulación previa por qPCR, el número de diluciones puede calcularse a partir de los resultados obtenidos. El lisado obtenido puede multiplicarse para obtener stocks de alto título usando cualquiera de las metodologías de multiplicación de fagos.

Multiplicación de fagos en medio líquido-método lento

Objetivo

El objetivo de este ensayo es obtener un stock de alto título de un bacteriófago determinado.

Fundamento

Este ensayo consiste en realizar una infección en medio líquido de una cepa sensible con el fago de interés, de forma de obtener un stock de muy alto título, a expensas del tiempo. La infección transcurre de forma lenta, asegurando de esta forma un máximo nivel de multiplicación fágica

Protocolo

1. Preparar un cultivo puro de la cepa de interés (incubar durante la noche a 37°C)
2. Tomar 0,1ml de cultivo bacteriano (OD₆₀₀=0,6) e inocular un tubo de 10ml de LM17 CaCl₂ 10mM
3. Incubar a 37°C durante al menos tres horas hasta observar turbidez

4. Tomar 0,1ml de lisado (el lisado puede ser un stock previamente preparado, o provenir de una única playa aislada como se menciona en el protocolo de aislamiento) e infectar el tubo de medio inoculado
5. Incubar a 37°C
6. Observar que ocurra lisis total (comparando con un control negativo)
7. Recuperar el lisado
8. Centrifugar a 5800rpm durante 15 minutos y recuperar el sobrenadante
9. Eliminar los restos celulares mediante filtración con filtros de 0,45µm
10. Realizar una titulación en placa o por qPCR para determinar la concentración final
11. Añadir glicerol hasta una concentración final de 15% y congelar a -70°C, o añadir cloroformo hasta una concentración del 0,1% y guardar a 4°C

Interpretación y observaciones

Este método de multiplicación permite obtener stocks con concentraciones hasta 10^{11} UFP/ml. La ventaja principal es la alta concentración de fagos que se obtiene al final en el stock. Este método tiene como desventaja que es muy susceptible a la contaminación. Cuando la manipulación no es la adecuada o el medio de cultivo no se encuentra correctamente esterilizado, es frecuente observar crecimiento celular en el lisado al día siguiente, lo que hace que el rendimiento del proceso sea menor, o que se interprete como un falso negativo (si no se realizan los controles por tinción correspondiente). En cualquier caso, si se observa crecimiento y no lisis total luego de la incubación, se recomienda descartar y repetir el ensayo

Multiplicación de fagos en medio líquido-método rápido

Objetivo

El objetivo de este ensayo es obtener un stock de alto título de un bacteriófago determinado

Fundamento

Este ensayo consiste en realizar una infección en medio líquido de una cepa sensible con el fago de interés, de forma de obtener rápidamente volumen de lisado a expensas de la concentración final. La infección transcurre en un período de aproximadamente dos horas desde la inoculación hasta la observación de lisis total

Protocolo

1. Preparar un cultivo puro de la cepa de interés en medio líquido (incubar durante la noche a 37°C)
2. Tomar 0,1ml de cultivo bacteriano ($OD_{600}=0,6$) e inocular un tubo de 10ml de LM17 $CaCl_2$ 10mM

3. Tomar 0,3ml de lisado (el lisado puede ser un stock previamente preparado, o provenir de una única playa aislada como se menciona en el protocolo de aislamiento) e infectar el tubo de medio inoculado
4. Incubar a 37°C
5. Observar que ocurra lisis total (comparando con un control negativo)
6. Recuperar el lisado
7. Centrifugar a 5800rpm durante 15 minutos y recuperar el sobrenadante
8. Eliminar los restos celulares mediante filtración con filtros de 0,45μ
9. Realizar una titulación en placa o por qPCR para determinar la concentración final
10. Añadir glicerol hasta una concentración final de 15% y congelar a -70°C, o añadir cloroformo hasta una concentración del 0,1% y guardar a 4°C

Interpretación y observaciones

Este método de multiplicación permite obtener stocks con concentraciones hasta 10^7 UFP/ml. La ventaja principal es el tiempo en que se pueden obtener grandes volúmenes del bacteriófago deseado. Esta técnica también puede ser utilizada como ensayo de sensibilidad/resistencia cuando el tiempo es una limitante, a expensas de los costos en material

Multiplicación de fagos en placa-ensayos DCA

Objetivo

El objetivo de este ensayo es obtener un stock de alto título de un bacteriófago determinado

Fundamento

Este ensayo es similar a los de recuento y aislamiento, con la diferencia de que en lugar de buscar obtener playas de lisis aisladas, se busca obtener lisis total en la placa, de forma de recuperar la mayor cantidad posible de bacteriófagos

Protocolo

1. Preparar un cultivo puro de la cepa de interés en medio líquido (incubar durante la noche a 37°C)
2. Tomar 0,1ml de cultivo e incubar en mesada con 0,1ml de lisado (el lisado puede ser un stock previamente preparado, o provenir de una única playa aislada como se menciona en el protocolo de aislamiento)
3. Transferir la mezcla incubada a un tubo con 5ml de LM17 CaCl₂ 10mM-Agar 0,7% termostatzado a 45°C. Mezclar con vortex por 5 segundos
4. Transferir el contenido del tubo a una placa de LM17 CaCl₂ 10mM. Agitar suavemente hasta que se cubra toda la superficie de la placa

5. Dejar secar en mesada durante 5 minutos, luego invertir la placa y dejar secar durante 10 minutos
6. Incubar a 37°C
7. Observar si ocurrió lisis total (comparando con un control negativo en el que se sembraron solo células)
8. Con un rastrillo estéril romper el *top* agar y añadir 5ml de buffer SM
9. Agitar en plataforma orbital durante al menos dos horas para que los fagos se liberen del agar
10. Recuperar el buffer con los fagos suspendidos
11. Eliminar los restos celulares mediante filtración con filtros de 0,45μ
12. Realizar una titulación en placa o por qPCR para determinar la concentración final
13. Añadir glicerol hasta una concentración final de 15% y congelar a -70°C, o añadir cloroformo hasta una concentración del 0,1% y guardar a 4°C

Interpretación y observaciones

Este método de multiplicación permite obtener stocks con concentraciones hasta 10⁹ UFP/ml. Una ventaja importante es que el stock obtenido esta disuelto en buffer SM y no en medio de cultivo, lo que incrementa la vida útil del stock (menos propenso a la contaminación con otros microorganismos).

Recuento de bacteriófagos en placa-ensayos DCA

Objetivo

El objetivo de este ensayo es cuantificar la carga viral presente en una muestra

Fundamento

Tanto para el aislamiento como para la cuantificación de fagos nos basamos en una técnica conocida como Doble Capa de Agar o DCA. La técnica de la doble capa de agar, permite cuantificar la concentración de bacteriófagos líticos en una suspensión dada, mediante la visualización macroscópica de playas de lisis. Cada una de las playas de lisis corresponde a una unidad formadora de playa o UFP. La concentración de fagos en la muestra se expresa en UFP/mL.

Protocolo

1. Tomar una muestra de leche y añadir ácido láctico hasta alcanzar un pH de 4,5 (si la muestra es de suero comenzar en el paso 2)
2. Centrifugar durante 15 minutos a 6000 rpm
3. Recuperar el sobrenadante y filtrarlo con un filtro de 0,45μm (se obtiene un filtrado libre de contaminantes o FLC)
4. Realizar diluciones seriadas 1:10 del FLC en MgSO₄ 10Mm (al menos 6)

5. Tomar 0,1ml del FLC e incubar en mesada durante 15 minutos con 0,1ml de cultivo de *S. thermophilus* fresco (hacer esto con todas las diluciones del FLC)
6. Transferir el cultivo incubado a un tubo con 5ml de LM17 CaCl₂ 10mM-Agar 0,7% termostatzado a 45°C. Mezclar con vórtex por 5 segundos
7. Transferir el contenido del tubo a una placa de LM17 CaCl₂ 10mM. Agitar suavemente hasta que se cubra toda la superficie de la placa
8. Dejar secar en mesada durante 5 minutos, luego invertir la placa y dejar secar durante 10 minutos
9. Incubar durante la noche a 37°C
10. Contar las playas de lisis en las placas donde el número (n) sea contable (25<n<250)

Interpretación y observaciones

El número de diluciones se estima intentando obtener una placa con playas contables, aunque no hay garantías previas de que no vayamos a ver lisis total en todas las placas. Si se realizó una titulación previa por qPCR, el número de diluciones puede estimarse a partir de los resultados obtenidos. Esta técnica nos asegura que los resultados de la titulación son exclusivamente de partículas viables.

Inducción de profagos con mitomicina C.

Objetivo

Este ensayo se realiza para la inducción de posibles profagos.

Fundamento

La mitomicina C es un antibiótico que actúa causando daño en el ADN bacteriano. Ante esta señal de daño, si existe un profago en el genoma de la bacteria, éste se verá liberado de su represión y entrará en ciclo lítico, produciendo la muerte del cultivo y liberación de su progenie.

Protocolo

1. Inocular 10ml de LM17 con 100µl de un cultivo incubado durante la noche a 37°C de la cepa de interés e incubar a 42°C.
2. Monitorear la absorbancia a 600nm hasta que el cultivo alcance un valor de 0,1.
3. Añadir mitomicina C a una concentración final de 0,01mM.
4. Monitorear la absorbancia del cultivo hasta que alcance la fase estacionaria o hasta observar lisis.

Interpretación y observaciones

Se recomienda corroborar los resultados del ensayo por PCR para determinar la presencia de fagos en el sobrenadante

Ensayo de sensibilidad resistencia basado en DCA-spot test

Objetivo

El objetivo de este ensayo es determinar la sensibilidad o resistencia de una cepa a uno o varios bacteriófagos.

Fundamento

Este ensayo es una variante de los ensayos basados en DCA. Consiste en infectar en una misma placa a una cepa con varios fagos y determinar su sensibilidad a estos virus. La principal ventaja sobre otros ensayos de DCA es que en una misma placa pueden realizarse múltiples ensayos, ahorrando de esta manera tiempo y material.

Protocolo

1. Preparar un cultivo puro de la cepa de interés en medio líquido (ON 37°C)
2. Transferir 150µl de cultivo a un tubo con 5ml de LM17 CaCl₂ 10mM-Agar 0,7% termostatzado a 45°C. Mezclar con vórtex por 5 segundos
3. Transferir el contenido del tubo a una placa de LM17 CaCl₂ 10mM. Agitar suavemente hasta que se cubra toda la superficie de la placa
4. Dejar secar en mesada durante 5 minutos, luego invertir la placa y dejar secar durante 10 minutos
5. Dividir la placa en tantos cuadrantes como fagos a testear
6. En cada cuadrante colocar una gota de 10µl de stock de fagos concentrado
7. Dejar que la gota se adsorba completamente en el agar (de ser necesario puede dejarse la placa entreabierto entre mecheros)
8. Incubar durante la noche a 37°C
9. Observar los cuadrantes para ver si hay ataque

Interpretación y observaciones

A las 24 horas se observará un crecimiento homogéneo en forma de tapiz en toda la placa por el crecimiento confluyente de la cepa bacteriana. Si la cepa es sensible a un determinado fago, se observará una zona traslúcida en la placa en el lugar donde se colocó la gota de lisado. Si la cepa es resistente se observa solo el crecimiento confluyente del tapiz de células bacterianas.

Evaluación de propiedades tecnológicas-curva de fermentación estándar

Objetivo

El objetivo de este ensayo es monitorear la cinética de conversión de lactosa en lactato por parte de cepas de *S. thermophilus*, en condiciones controladas. Los resultados de estos ensayos permiten comparar y evaluar a las cepas resistentes obtenidas como potenciales iniciadores industriales

Fundamento

La lactosa es la principal fuente de carbono utilizada por las bacterias lácticas durante su crecimiento en leche. El metabolismo de la lactosa es un proceso anaerobio, cuyo principal metabolito es el ácido láctico. La conversión de lactosa a lactato, puede medirse mediante el monitoreo de los cambios de pH a lo largo del proceso fermentativo. La velocidad de conversión depende de varios factores, que va desde la naturaleza de cada cepa, a la composición de la leche, temperatura de la fermentación y edad del cultivo. En este ensayo, es importante eliminar todas las variables posibles, a fin de evaluar únicamente aquellas que dependen exclusivamente de la naturaleza de la cepa (propiedades intrínsecas).

Protocolo

1. Realizar un aislamiento en placa de la cepa a evaluar
2. Tomar un clon aislado con un escarbadiante estéril, inocular 30ml de LM17 e incubar durante la noche a 37°C
3. Medir la concentración celular mediante espectrofotometría y estandarizar a 0,6 (OD=600nm)
4. Preparar 100ml de leche descremada reconstituida al 10%, someter a vapor fluente durante 15 minutos y termostaizar a 42°C
5. Inocular la leche al 5% con el cultivo estandarizado, agitar y poner en baño a 42°C
6. Monitorear el cambio de pH cada media hora durante al menos tres horas
7. Construir la curva de pH en función del tiempo

Interpretación y observaciones

La curva de fermentación obtenida puede llegar a variar levemente cada vez que se realiza debido a factores que escapan al control de la estandarización (por ejemplo diferencias en los lotes de leche en polvo), es por eso que siempre que se hace un ensayo con el fin de comparar el perfil de acidificación de una nueva BIM, debe realizarse en paralelo un ensayo control con la cepa madre.

Ensayo de fermentación con distintas concentraciones iniciales de fago

Objetivo

El objetivo de este ensayo es determinar la influencia en el perfil de acidificación en leche de la bacteria, con diferentes concentraciones iniciales de bacteriófagos.

Fundamento

Este protocolo implica la realización de una curva estándar de fermentación, con la diferencia de que los cultivos se inoculan a tiempo 0 con diferentes concentraciones de fagos. El control de la fermentación se lleva a cabo de forma similar a una fermentación estándar.

Protocolo

1. Realizar un aislamiento en placa de la cepa a evaluar
2. Tomar un clon aislado con un escarbadiante estéril, inocular 30ml de LM17 e incubar durante la noche a 37°C
3. Medir la concentración celular mediante espectrofotometría y estandarizar a 0,6 (OD=600nm)
4. Preparar 100ml de leche descremada reconstituida al 10%, someter a vapor fluente durante 15 minutos y termostaizar a 42°C
5. Inocular la leche al 5% con el cultivo estandarizado
6. Inocular la leche con una alícuota de fago con la concentración deseada
7. agitar y poner en baño a 42°C
8. Monitorear el cambio de pH cada media hora durante al menos tres horas
9. Construir la curva de pH en función del tiempo

Interpretación y observaciones

Los resultados esperados para este ensayo son variaciones en los perfiles de acidificación correlacionados con la concentración inicial de fagos. Para evitar sesgos, se recomienda llevar a acabo los ensayos en simultáneo utilizando el mismo lote de leche en polvo para evitar variaciones en la curva asociadas con la misma.

Ensayo de infección para determinar variaciones en el título viral (ΔF), dependiendo de la concentración inicial de fagos.

Objetivo

El objetivo de este experimento es determinar diferencias en la variación en el título viral o ΔF dependiendo de la concentración inicial de fagos.

Fundamento

En este ensayo, un cultivo con una concentración bacteriana estandarizada es infectado con una alícuota de fagos de concentración conocida y se espera a que ocurra la lisis total. Una vez ocurrida la lisis, se analiza el título fágico y se vuelve a inocular el cultivo con la misma concentración de bacteria, de forma que la infección comience nuevamente en las mismas condiciones con la excepción de que el título viral inicial será mayor. La cantidad de medidas y re inoculaciones depende del ensayo.

Protocolo

1. Preparar un cultivo puro de la cepa de interés en medio líquido (incubado durante la noche a 37°C)
2. Tomar 1ml de cultivo bacteriano ($OD_{600}=0,6$) e inocular un tubo de 10ml de LM17 $CaCl_2$ 10mM
3. Tomar una alícuota de lisado de concentración conocida e infectar el tubo de medio inoculado.
4. Incubar a 37°C
5. Observar que ocurra lisis total (comparando con un control negativo solo con cultivo bacteriano)
6. Tomar una alícuota para titular y posteriormente re inocular el tubo con 1ml de cultivo bacteriano ($OD_{600}=0,6$)
7. Repetir los pasos del 4 al 6 las veces deseadas.

Interpretación y observaciones

Los resultados esperados para este ensayo son variaciones en los ΔF relacionados con la concentración inicial de fagos. Dado que el ensayo se lleva a cabo en un mismo tubo de cultivo, no se recomienda realizar muchas re inoculaciones ya que la disponibilidad de nutrientes luego de muchas fases puede afectar el crecimiento bacteriano y reflejarse en los resultados.

Generación de mutantes fago-resistentes (BIMs) en medio líquido

Objetivo

El objetivo de este ensayo es obtener cepas con fenotipo resistente, que mantengan las propiedades tecnológicas de la cepa madre sensible.

Fundamento

El proceso básicamente consiste en infectar cultivos puros de una cepa sensible con los fagos correspondientes, y esperar a recuperar alguna célula sobreviviente. Estos sobrevivientes al proceso de infección son los mutantes espontáneos. A lo largo del proceso de infección lítica, las células se lisan a medida que la multiplicación fágica ocurra. A su vez, pueden llegar a ocurrir eventos de muy baja frecuencia que determinen la aparición espontánea de células resistentes. Estos clones resistentes o BIMs (*bacteriophage insensitive mutant*), pueden ser recuperados y potencialmente utilizados como iniciadores industriales. A continuación se detalla la metodología de generación.

Protocolo

1. Realizar un aislamiento en placa de la cepa madre a utilizar
2. Tomar un clon aislado con escarbadiante estéril e inocular 10ml de LM17. Crecer durante la noche a 37°C.
3. Tomar 0,2ml de cultivo ON e incubar en 10ml de LM17 con una alícuota de/los fago/s elegidos (0,05-0,1ml aprox.). Dejar que ocurra la lisis total durante 24 horas a 37°C.
4. Recuperar 0,1ml del lisado e incubar 24 horas a 37° en LM17 y ver si hay crecimiento.
5. Realizar un aislamiento en placa a partir del cultivo y congelar el resto. Si a las 24 horas se observan colonias y morfología al microscopio típicas de *S. thermophilus* continuar con el siguiente paso.
6. Tomar una colonia aislada con escarbadiante estéril e inocular 10ml de LM17. Crecer durante la noche a 37°C.
7. Tomar 0,2ml de cultivo e incubar en 10ml de LM17 con una alícuota de/los fago/s elegidos (0,05-0,1ml aprox). Dejar que transcurra la infección por 24 horas a 37°C. Si se observa lisis total, comenzar nuevamente desde el paso 6. Si se observa crecimiento, continuar con el siguiente paso.
8. Realizar un aislamiento en placa a partir del cultivo y congelar el resto. Si a las 24 horas se observan colonias y morfología al microscopio típicas de *S. thermophilus* continuar con el siguiente paso.
9. Tomar una colonia aislada con escarbadiante estéril e inocular 10ml de LM17. Crecer durante la noche a 37°C
10. Tomar 0,2ml de cultivo e incubar en 10ml de LM17 con una alícuota de/los fago/s elegidos (0,05-0,1ml aprox.). Dejar que transcurra la infección por

- 24 horas a 37°C. Si se observa lisis total, comenzar nuevamente desde el paso 9. Si se observa crecimiento, continuar con el siguiente paso.
11. Alicuotar el cultivo y congelarlo a -70°. Realizar un aislamiento en placa y tinción de Gram. Si las colonias y la morfología no son típicas de *S. thermophilus*, retomar desde el paso 9. Si las colonias y la morfología son las correctas, se considera el clon como cepa resistente de tercera generación y se continúa con el paso 12.
 12. Tomar una colonia aislada con escarbadiante estéril e inocular 10ml de LM17. Crecer durante la noche a 37°C
 13. Realizar una fermentación en leche descremada estéril, usando como inóculo una alícuota del cultivo obtenido en el paso 12 (5% OD₆₀₀= 0,6). Si la curva de acidificación se ajusta a la obtenida para la cepa madre, la cepa se conserva, de lo contrario la cepa no se considera adecuada para funcionar como cultivo iniciador industrial.
 14. Una vez concluidos los pasos anteriores, las cepas deben ser congeladas y realizado un test de verificación de resistencia una semana después (spot test) para corroborar que no haya reversiones en el fenotipo resistente.

Interpretación y observaciones

Los eventos de adquisición de resistencia son muy bajos (una célula por cada 10⁶ infectadas), es por esto que se debe tener especial cuidado en la manipulación. Al producirse la lisis total en cualquiera de los pasos, cualquier célula contaminante puede crecer y generar turbidez en el medio de cultivo, haciendo casi imposible la recuperación de BIMs. Para evitar estos problemas, debe manipularse todo el material en las condiciones más exigentes posibles de asepsia (preferentemente en flujo laminar). El material de trabajo (tips, tubos, etc.) debe ser previamente esterilizado por calor y luz UV (al menos 30 minutos de exposición), el medio de cultivo debe autoclavarse y filtrarse con filtros de 0,22µm, las pipetas deben esterilizarse con alcohol 70% y exponerse al UV al menos 30 minutos, así como los guantes, gradillas y frascos de descarte. Es imprescindible higienizarse las manos y antebrazos con jabón y alcohol previo a la manipulación, se recomienda utilizar dos pares de guantes.

Generación de mutantes fago-resistentes (BIMs) en medio sólido

Objetivo

El objetivo de este ensayo es obtener cepas con fenotipo resistente, que mantengan las propiedades tecnológicas de la cepa madre sensible.

Fundamento

El proceso consiste en infectar cultivos puros de la cepa sensible con los fagos correspondientes, y recuperar alguna célula sobreviviente. Estos sobrevivientes al proceso de infección son los mutantes espontáneos. A lo largo del proceso de infección lítica, las células se lisan a medida que la multiplicación fágica ocurra. A su vez, pueden llegar a ocurrir eventos de muy baja frecuencia que determinen la aparición espontánea de células resistentes. Estos clones resistentes o BIMs, pueden ser recuperados y potencialmente utilizados como iniciadores industriales.

Protocolo

1. Realizar aislamiento en placa de la cepa madre a utilizar
2. Tomar un clon aislado con escarbadiante estéril e inocular 10ml de LM17. Crecer durante la noche a 37°C.
3. Transferir 400µl de cultivo y una alícuota de concentrado fágico (concentración final aprox. 10^7 ufc/ml) a un tubo con 5ml de LM17 CaCl₂ 10mM-Agar 0,7% termostatzado a 45°C. Mezclar con vortex por 5 segundos
4. Transferir el contenido del tubo a una placa de LM17 CaCl₂ 10mM. Agitar suavemente hasta que se cubra toda la superficie de la placa
5. Dejar secar en mesada durante 5 minutos, luego invertir la placa y dejar secar durante 10 minutos
6. Incubar a 37°C durante 72 horas, o hasta que aparezcan colonias aisladas
7. Recuperar las colonia aisladas e incubarlas en LM17 durante la noche a 37°C
8. Alicuotar el cultivo y congelarlo a -70°C. Realizar un aislamiento en placa y tinción de Gram. Si las colonias y la morfología no son típicas de *S. thermophilus*, se considera contaminación y se descarta el cultivo. Si las colonias y la morfología son las correctas, se considera el clon como cepa potencialmente resistente y se continúa con el paso siguiente.
9. Realizar un ensayo de sensibilidad resistencia, si la cepa no resulta resistente, se descarta el clon.
10. Realizar una fermentación estándar para corroborar que la nueva cepa cumple con los parámetros de la cepa madre
11. Una vez concluidos los pasos anteriores, las cepas deben ser congeladas y realizado un test de verificación de resistencia una semana después (spot test) para corroborar que no haya reversiones en el fenotipo resistente.

Interpretación y observaciones

Los eventos de adquisición de resistencia son muy bajos (una célula por cada 10^6 infectadas), es por esto que se debe tener especial cuidado en la manipulación. Al producirse la lisis total en cualquiera de los pasos, cualquier célula contaminante puede crecer y dar colonias de aspecto similar a las esperadas. Son de suma importancia las etapas de control y observación microscópica de las potenciales resistentes obtenidas, a fin de no obtener falsos positivos.

Extracción de ADN bacteriano (protocolo 1)

Objetivo

El objetivo de este protocolo es obtener ADN total a partir de cultivos puros de *S. thermophilus*.

Fundamento

Este es un método estándar de extracción de ADN para microorganismos Gram +. Se utiliza bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), un detergente catiónico con la propiedad de precipitar ácidos nucleicos en soluciones de baja concentración iónica, permaneciendo las proteínas y polisacáridos neutros en solución. En soluciones con altas concentraciones iónicas, el CTAB precipitará proteínas y polisacáridos neutros, dejando los ácidos nucleicos en solución.

Protocolo

1. Centrifugar 5ml de cultivo puro de *S. thermophilus* por 5 minutos a 13000 rpm.
2. Descartar sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en 0,5ml de buffer TE25S.
4. Añadir 10µl de solución de lisozima, mezclar gentilmente e incubar a 37° durante 30 minutos.
5. Añadir 5µl de solución de proteinasa K y 30µl de SDS 10%.
6. Mezclar por inversión e incubar a 55°C durante 60 minutos. Mezclar por inversión ocasionalmente durante este tiempo.
7. Añadir 100µl de NaCl 5M y mezclar por inversión.
8. Añadir 65µl de solución CTAB/NaCl.
9. Mezclar vigorosamente e incubar a 55°C durante 10 minutos.
10. Termostatar a 37°C. Añadir 500µl de cloroformo:isoamílico (24:1) y agitar en orbital durante 30 minutos.
11. Centrifugar a máxima velocidad durante 15 minutos.
12. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
13. Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol y mezclar por inversión.

14. Centrifugar a máxima velocidad a 4°C durante 10 minutos.
15. Lavar el pellet con etanol 70%.
16. Secar el pellet y resuspender en 50µl de agua MQ.
17. Añadir 1µl de RNasa (1mg/ml) e incubar durante 15 minutos a 37°C
18. Guardar a -20°C

Interpretación y observaciones

El ADN obtenido puede visualizarse mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio (0,5µg/ml). El resultado esperado es una única banda en la parte superior del gel (por encima de la banda mas grande del marcador de peso molecular Smart Ladder Eurogentec). El grosor de la banda permite cuantificar la cantidad de ADN obtenido mediante comparación con las bandas del marcador. En caso de observarse *smears* o no verse banda, el protocolo debe repetirse.

Buffer TE25S

25mM Tris HCl, pH 8

25mM EDTA, pH 8

0,3M sacarosa

Solución CTAB/NaCl

0,7M NaCl

10% CTAB

Calentar la solución de NaCl 0,7M a 55° y añadir el CTAB lentamente hasta disolver

Solución de lisozima

100mg/ml en agua

Solución de proteinasa K

20mg/ml en agua

Extracción de ADN bacteriano (protocolo 2)

Objetivo

El objetivo de este protocolo es obtener ADN total a partir de cultivos puros de *S. thermophilus*.

Fundamento

Este es un método estándar de extracción de ADN para microorganismos Gram +. En este protocolo, el acetato de potasio es utilizado para precipitar proteínas y otros sólidos, dejando los ácidos nucleicos en solución, los cuales pueden recuperarse en etapas posteriores.

Protocolo

1. Centrifugar 10ml de cultivo puro de *S. thermophilus*, durante 15 minutos a 13000 rpm.
2. Resuspender el pellet en 1ml de solución de NaCl 0,85%.
3. Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm.
4. Descartar el sobrenadante. Añadir 200µl de solución de lisozima y mezclar por inversión. Incubar 15 minutos a 37°C.
5. Añadir 400µl de SDS 3%, mezclar por inversión e incubar a temperatura ambiente 7 minutos.
6. Añadir 300µl de KAc 3M (frío). Mezclar vigorosamente.
7. Incubar 5 minutos en hielo. Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.
8. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo. Añadir 650µl de isopropanol y mezclar por inversión.
9. Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm.
10. Descartar el sobrenadante. Resuspender el pellet en 320µl de agua MQ y agitar en orbital durante 10 minutos.
11. Añadir 200µl de NH₄Ac 7,5M y 350µl de fenol:cloroformo (1:1). Mezclar por inversión.
12. Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.
13. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo. Añadir un volumen de cloroformo y mezclar por inversión.
14. Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.
15. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo. Añadir 1ml de etanol 90% y agitar por inversión.
16. Centrifugar 15 minutos a 13000 rpm.
17. Lavar el pellet con etanol 70%.
18. Secar el pellet y resuspender en 50µl de agua MQ.
19. Añadir 1µl de RNasa (1mg/ml) e incubar durante 15 minutos a 37°C
20. Guardar a -20°C

Interpretación y observaciones

El ADN obtenido puede visualizarse mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio (0,5µg/ml). El resultado esperado es una única banda en la parte superior del gel (por encima de la banda mas grande del marcador de peso molecular Smart Ladder Eurogentec). El grosor de la banda permite cuantificar la cantidad de ADN obtenido mediante comparación con las bandas del marcador. En caso de observarse *smears* o no verse banda, el protocolo debe repetirse.

Solución de lisozima

25% sacarosa

60mg/ml lisozima

Extracción de ADN viral (Lambda DNA Kit, Qiagen)

Objetivo

El objetivo de este protocolo, es obtener ADN viral extremadamente puro para poder secuenciar el genoma completo del fago.

Fundamento

Este método implica el uso del kit de Qiagen Lambda DNA kit. El protocolo de extracción tiene algunas modificaciones con respecto al original. Mediante este método, pueden realizarse mini, midi y maxipreps variando algunas condiciones del protocolo según corresponda.

Protocolo

Este protocolo esta diseñado para la obtención de aprox 12µg (mini), 60µg (midi) o 300µg (maxi) de ADN fágico a partir de cultivos líquidos. Los diferentes volúmenes para cada tipo de preparación están representados en colores.

1. Añadir 30µl, 100µl o 400µl de buffer L1 a 10ml, 50ml o 250ml de cultivo respectivamente. Añadir 0,1ml, 0,5ml o 2,5ml de MgSO₄ 1M. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
2. Añadir PEG 8000 a una concentración final de 10% e incubar en hielo por 60 minutos.
3. Centrifugar a >10000g por 10 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante.
4. Resuspender el pellet en 1ml, 3ml o 9ml de buffer L3. Añadir 50µl, 150µl o 450µl de solución de proteinasa K. Incubar a 65°C durante 30 minutos.
5. Añadir 1ml, 3ml o 9ml de buffer L4 y mezclar suavemente. Incubar a 70°C por 10, 20 o 20 minutos y enfriar en hielo.
6. Añadir 1ml, 3ml o 9ml de buffer L5, mezclar rápido pero suavemente. Centrifugar a >15000g por 30 minutos a 4°C. Recuperar el sobrenadante rápidamente.
7. Centrifugar el sobrenadante nuevamente a >15000g por 10 minutos a 4°C para obtener lisado libre de partículas.
8. Equilibrar una columna QIAGEN-tip20, -tip100 o -tip500 con 2ml, 10ml o 30ml de buffer QBT.
9. Colocar el sobrenadante del paso 7 en la columna, y dejar que entre en la resina por gravedad.
10. Lavar la columna con 2ml, 10ml o 30ml de buffer QC.
11. Trasladar la columna a un tubo limpio. Eluir el ADN con 1,5ml, 5ml o 15ml de buffer QF.
12. Precipitar el ADN con 0,4 volúmenes de isopropanol. Centrifugar a >15000g durante 30 minutos.
13. Lavar el pellet con etanol 70%. Dejar secar el pellet.

14. Resuspender el pellet en 50µl, 150µl o 500µl de 10mM Tris-HCl pH 8.
15. Conservar a -20°C.

Interpretación y observaciones

Existen varios puntos críticos en este protocolo en los que se debe tener especial cuidado. El pellet esperado en el paso 4, puede no ser visible a simple vista. El PEG puede acumularse en un área grande de la pared del tubo, por lo que a la hora de resuspender, deben lavarse las paredes del tubo con esmero hasta que la solución adquiera un aspecto turbio. El lisado a obtener en el paso 7, debe estar completamente libre de partículas. Es de especial importancia este punto, ya que cualquier partícula sólida puede tapar o dañar la resina de la columna de purificación.

<u>Buffer L1</u>	<u>Buffer L3</u>	<u>Buffer L4</u>
300mM NaCl	100mM NaCl	SDS 4%
100mM Tris-HCl, pH 7,5	100mM Tris-HCl, pH 7,5	
10mM EDTA	25mM EDTA	<u>Buffer QC</u>
0,2mg/ml BSA		1M NaCl
20mg/ml RNasa A	<u>Buffer QBT</u>	50mM MOPS, pH 7
6mg/ml DNasa I	750mM NaCl	15% etanol
	50mM MOPS, pH7	
<u>Buffer L5</u>	15% etanol	
3M Acetato de potasio, pH 5,5	0,15% Triton X-100	
<u>Buffer QF</u>	<u>Solución proteinasa K</u>	
1,25M NaCl	20mg/ml en solución de	
50mM Tris-HCl, pH 8,5	10mM Tris-HCl pH 7,5, 20mM	
15% etanol	CaCl y 50% glicerol	

Extracción de ADN viral

Objetivo

El objetivo de este protocolo es la obtención de ADN viral para ensayos moleculares.

Fundamento

Este protocolo permite obtener ADN fágico a partir de cultivos líquidos, sin utilizar columna de purificación. La calidad y pureza del ADN obtenida es suficiente para realizar ensayos moleculares como PCR o perfiles de restricción, aunque no es recomendable utilizarlo para secuenciación completa de genomas.

Protocolo

1. Añadir 200µl de DNasa I (1mg/ml) y 200µl de RNasa (1mg/ml) a 10ml de lisado fágico filtrado. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
2. Agregar PEG 6000 a una concentración final de 10%. Disolver mediante agitación orbital. Dejar precipitando durante la noche a 4°C.
3. Centrifugar a 10000g a 4°C durante 20 minutos.
4. Resuspender el pellet en 1ml de NaCl 1M.
5. Añadir 100µl de buffer de lisis, mezclar por inversión e incubar a 65°C durante 30 minutos.
6. Agregar 200µl de KAc 8M frío. Incubar en hielo 30 minutos.
7. Centrifugar a 160000g por 30 minutos. Recuperar el sobrenadante.
8. Extraer dos veces con 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1), centrifugando a máxima velocidad.
9. Recuperar la fase acuosa. Añadir un volumen de isopropanol y centrifugar a máxima velocidad durante 20 minutos a 4°C.
10. Lavar el pellet con etanol 70%. Dejar secar el pellet.
11. Resuspender el pellet en 25µl de agua MQ.

Interpretación y observaciones

El ADN obtenido puede visualizarse mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio (0,5µg/ml). El resultado esperado es una única banda en la parte superior del gel (por encima de la banda mas grande del marcador de peso molecular Smart Ladder Eurogentec). El grosor de la banda permite cuantificar la cantidad de ADN obtenido mediante comparación con las bandas del marcador. En caso de observarse *smears* o no verse banda, el protocolo debe repetirse.

Purificación de fagos por gradiente discontinuo de CsCl

Objetivo

El objetivo de este ensayo, es obtener lisados de alta concentración (iguales o superiores a 10^{12} ufp/ml), puros, para diferentes ensayos, incluyendo el estudio de perfiles de proteínas virales.

Fundamento

La separación por ultracentrifugación en gradiente, es una técnica que permite separar pequeñas partículas como organelos o virus, e incluso macromoléculas gracias a su densidad. En el caso de este protocolo en particular, se preparan los tubos de centrifuga añadiendo soluciones de CsCl de diferente densidad (decreciente desde el fondo), y encima se agrega la solución que contiene las partículas virales (esta solución debe ser menos densa que todas las soluciones de CsCl). Al ser sometidas a fuerzas g extremas, las partículas se desplazarán hacia el extremo del tubo hasta acumularse en una región donde la densidad de la solución de CsCl sea similar a las mismas, no pudiendo desplazarse más allá. La concentración de partículas se observa como una banda opaca en el tubo, la cual puede recuperarse.

Protocolo

1. Inocular 10ml de cultivo puro de *S. thermophilus* (incubado durante la noche a 37°C) en 1L de medio LM17 0,5X.
2. Incubar a 42°C hasta que el cultivo alcance una OD₆₀₀ de 0,1.
3. Agregar CaCl₂ hasta una concentración final de 10mM.
4. Inocular con un lisado fágico puro, a una concentración final de 10^4 - 10^5 fagos/ml.
5. Incubar a 42°C hasta observar lisis total del cultivo.
6. Centrifugar a 10000g durante 15 minutos a 4°C para eliminar restos bacterianos.
7. Recuperar el sobrenadante en una botella estéril con un agitador magnético dentro.
8. Agregar NaCl (concentración final 0,5M) y PEG 8000 (concentración final 10%).
9. Disolver el PEG agitando a temperatura ambiente e incubar durante la noche a 4°C con agitación leve.
10. Centrifugar a 10000g durante 15 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante.
11. Resuspender el pellet en 5ml de buffer ϕ 1X.
12. Agregar 1 volumen de cloroformo y mezclar por inversión.
13. Centrifugar a 5000g durante 20 minutos.
14. Recuperar la fase acuosa
15. Preparar tres soluciones de CsCl en buffer ϕ

- i. Solución A: 4,2g en un volumen final de 8ml (densidad=1,35)
 - ii. Solución B: 6,2g en un volumen final de 8ml (densidad=1,53)
 - iii. Solución C: 8,2g en un volumen final de 8ml (densidad=1,65)
16. Preparar gradiente en los tubos de centrifuga
- i. Agregar 1,5ml de solución A al tubo.
 - ii. Añadir 2ml de solución B, llevando la pipeta hasta el fondo del tubo, y liberando el contenido muy lentamente, para que la solución A sea desplazada hacia arriba.
 - iii. Añadir 1,5ml de solución C, llevando la pipeta hasta el fondo del tubo, y liberando el contenido muy lentamente, para que las soluciones A y B sean desplazadas hacia arriba.
 - iv. Depositar sobre la superficie del gradiente el lisado obtenido en el paso 14, dejando 2-3mm libres en la superficie del tubo.
17. Centrifugar a 210000g durante 3 horas a 20°C.
18. Retirar lentamente los tubos, y colocarlos en un soporte.
19. Recuperar la banda formada utilizando una jeringa de 10cc provista de aguja hipodérmica.
20. Remover el CsCl del lisado mediante diálisis en buffer ϕ .
21. Realizar un recuento en placa para determinar la concentración del lisado obtenido.

Interpretación y observaciones

Es importante que el gradiente no se rompa en ningún momento. Si el gradiente ha sido correctamente preparado, se pueden observar diferencias en la refracción al poner el tubo a contra luz. Si el gradiente se rompe o se introducen burbujas de aire accidentalmente, debe prepararse nuevamente, teniendo sumo cuidado en no mover demasiado los tubos.

En el caso que al finalizar la centrifugación se observen más de una banda, deben recuperarse todas y determinar al final del proceso cual de ellas corresponde al concentrado de fagos, mediante spot test.

Buffer ϕ

20mM Tris-HCl, pH 7,4

100mM NaCl

10mM MgSO₄

Perfiles de restricción

Objetivo

El objetivo de estos ensayos es generar patrones de bandas que permitan comparar distintos genomas virales, mediante el uso de enzimas de restricción.

Protocolo

Para la construcción de los perfiles, se utilizaron las enzimas de restricción *EcoRI* (Promega) y *EcoRV* (New England Biolabs)

1. Incubar ON a 37°C por separado una alícuota de ADN con la enzima correspondiente (volumen final 20µl).
2. Cargar todo el volumen de reacción en un gel de agarosa 2%, teñido con el agente revelador GoodView (Ecoli s.r.o)
3. Correr hasta que el perfil de corrida alcance $\frac{3}{4}$ de la longitud del gel.

Interpretación y observaciones

La electroforesis fue realizada en geles de un largo aproximado de 20 centímetros. El progreso de la corrida puede chequearse periódicamente en transiluminador, para estar seguros de que todas las bandas se han separado y ninguna se haya escapado del gel.

Amplificación de las regiones CRISPR

Objetivo

El objetivo de estos ensayos es la amplificación de las regiones CRISPR de *S. thermophilus*.

Fundamento

Para este ensayo se utilizan cuatro sets de cebadores específicos para las cuatro posibles regiones CRISPR diferentes detalladas en la tabla. Este no es un ensayo tipo multiplex, cada región se amplifica preparando una mix diferente. Se detalla el protocolo utilizando la enzima *Taq DNA Polymerase* de la empresa Feldan. Los cebadores fueron diseñados por el equipo del Dr. Sylvain Moineau en la Université Laval, Quebec, Canadá.

Protocolo

Mix para una reacción	Ciclo de reacción
5µl 10X PCR buffer	94°C – 3 minutos
1µl dNTPs 10mM	94°C – 45 segundos
1µl de cada cebador 10µM	60°C – 1 minuto
1µl Band Sharpener	72°C – 1 minuto
0,5µl <i>Taq</i>	72°C – 7 minutos
1µl ADN	25°C – 10 minutos
39,5µl agua MQ	Los pasos marcados en negrita se repiten 35 veces
Volumen final de la reacción: 50µl	

Interpretación y observaciones

Los productos de PCR se visualizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio (0,5µg/ml). El tamaño de las regiones es variable, por lo que en algunos casos deben ajustarse los tiempos de extensión para obtener resultados óptimos.

Tabla 8: cebadores utilizados

Cebador	Secuencia	T _m
CR1-up	5'-TGCTGAGACAACCTAGTCTCTC-3'	64°C
CR1-down	5'-TAAACAGAGCCTCCCTATCC-3'	61°C
CR2-up	5'-GCCCCTACCATAGTGCTGAAAAATTAG-3'	66°C
CR2-down	5'-CCAAATCTTGTGCAGGATGGTCG-3'	67°C
CR3-up	5'-GGTGACAGTCACATCTTGTCTAAAACG-3'	66°C
CR3-Trail2R	5'-GCTGGATATTCGTATAACATGTC-3'	60°C
CR4-up	5'-CCTCATAGAGCTTTGAAAGATGCTAGAC-3'	65°C
CR4-down	5'-CTATCTTTAAGATATGCTGCTTACAACGGC-3'	66°C

Secuenciación y análisis de regiones CRISPR

Objetivo

El objetivo de estos análisis es estudiar los repetidos y secuencias espaciadoras, y determinar su origen.

Fundamento

El análisis de las secuencias CRISPR, permiten determinar el origen de los espaciadores, así como su localización en el genoma de los fagos a estudiar. Los cebadores utilizados en estos ensayos fueron diseñados por el equipo del Dr. Sylvain Moineau en la Université Laval, Quebec, Canadá.

Protocolo

1. Los amplicones obtenidos de la amplificación por PCR, son secuenciados utilizando los cebadores descritos en las tablas correspondientes.
2. El ensamblaje de la secuencia a partir de los *contigs* es realizado usando el software Staden Package (<http://staden.sourceforge.net>).
3. Una vez ensamblada la secuencia, es analizada usando el software CRISPRfinder (<http://crispr.u-psud.fr>).
4. Las secuencias espaciadoras obtenidas como output pueden analizarse mediante BLAST con bases de datos para determinar su origen, o buscar su presencia en genomas virales.

Interpretación y observaciones

El software de análisis del Staden Pack, permite editar los *contigs* en busca de corregir potenciales errores de secuenciación. Es importante tener especial cuidado en este punto, pues variaciones en una base en las secuencias espaciadoras pueden llevar a errores importantes. En caso de no poder ensamblar los *contigs*, se debe determinar si el problema es de calidad en la secuencia, o posibles gaps. Si el problema es de calidad, debe reenviarse a secuenciar. Si por el contrario se trata de gaps en la secuencia, deben diseñarse nuevos cebadores para secuenciar las regiones faltantes.

Tabla 9: cebadores utilizados

Cebador CRISPR 1	Secuencia	Tm
CR1-F	5'-TACATGAGCAAAGTCGTTAGAGGGAGG-3'	68°C
CR1-Cas9F1	5'-GTATCGACAAATCAGGTAAGGCTGAG-3'	65°C
CR1-Cas9F2	5'-GGCTTTAGATAGTATGGATGATGCGTGG-3'	67°C
CR1-Cas9F3	5'-TGGAGAGCGGATGTCTATTTCATAAGACT-3'	67°C

CR1-Cas1F	5'-TGGCTAGAATAGTGGCGGGTTATGG-3'	69°C
CR1-Csn2F	5'-GAGGAGCCTACCATACTTGATGAAGTTG-3'	67°C
CR1-R	5'-TAACTGTCCTTGTCAATCCTTACTTTC-3'	62°C
CR1-Csn2R	5'-TGTTCCCTTTCTTGTATTCCATCTGCTCC-3'	67°C
CR1-Cas1R	5'-CTGTCAATCCCAACCTATACTCATAC-3'	63°C
CR1-tracrR	5'-TCGGCATGAAGCCTTATCTTTGTAG-3'	65°C
CR1-Cas9R1	5'-TGTCTTGTCGCATAAATAGTGGCATC-3'	65°C
CR1-Cas9R2	5'-AAGTCGTGTTAGGATAGTCATTTGCTC-3'	65°C
CR1-Cas9R3	5'-AATTCTTGTTGAGTTTGCAGTATCC-3'	61°C

Tabla 10: cebadores utilizados

Cebador CRISPR 2	Secuencia	Tm
CR2_F	5'-TCGAAATGTTTCATCGCTGGTGCCTC-3'	70°C
CR2_Cas1F1	5'-GGTAATGCACAACCTGACCACCCAACTC-3'	70°C
CR2_Cas1F2	5'-GGAGTAGACGGACTGCGGAGGATTG-3'	71°C
CR2_Cas2F	5'-CCTCAGCGAAGAAGAGCGTGAGTTTG-3'	70°C
CR2_upR	5'-AGTTGCTAGAGGCACAAGATGTAGG-3'	67°C
CR2_Cas2R	5'-CAAACCTCAGCTCTTCTTCGCTGAGG-3'	70°C
CR2_Cas1R	5'-ACAATCCTCCGCAGTCCGTCTACTC-3'	71°C
CR2_DownF	5'-CGCCCAATGAGTTGAAAAGTAC-3'	62°C
CR2_Cas6F	5'-TTCCTACGTCATCTTCCCGTCTATGC-3'	68°C
CR2_Cas10F1	5'-AGTCAAATGAGGAGAGTGACGAGGATG-3'	68°C
CR2_Cas10F2	5'-GAGCGAACTGAACTCACCTGAAAGC-3'	68°C
CR2_Cas10F3	5'-GGGAGCTAGAAGAAGCAGCTAAAGG-3'	67°C
CR2_Csm3F	5'-CCAACATACCGATCATTCCTGGTTCAAG-3'	68°C
CR2_Csm4F	5'-AACCAAGACAAGTTCACGCTCACAGATG-3'	69°C
CR2_Csm5F1	5'-AGCCTCCTGACACTTGCTCCAATTC-3'	70°C
CR2_Csm5F2	5'-GCGGTGCTTGGACAAAGACTC-3'	67°C
CR2_Csm6F	5'-CGATGACTCCCAAGAGAAGGCTTTGA-3'	69°C

CR2_pyrF R	5'-AGGGAAATCAAGGGCAATAACAGGAC-3'	67°C
CR2_Csm6R	5'-TCAAAGCCTTCTCTTGGGAGTCATCG-3'	69°C
CR2_Csm5R1	5'-TAGAGTCTTTGTCCAAGCACCGC-3'	68°C
CR2_Csm5R2	5'-ATGAATTGGAGCAAGTGTGAGGAGG-3'	67°C
CR2_Csm4R	5'-TTTGCTTGACGGCGAACCTCTTTGAC-3'	70°C
CR2_Csm3R	5'-TCAGCGTTTGACAAGAAGGCATCAC-3'	68°C
CR2_Cas10R1	5'-CCTTTAGCTGCTTCTTCTAGCTCCC-3'	67°C
CR2_Cas10R2	5'-TCTCAACGGAATGACAAATCTCGCAC-3'	68°C
CR2_interCas6-10R	5'-TCTCATCAAACCAATCCGCGCCTAC-3'	70°C

Tabla 11: cebadores utilizados

Cebador CRISPR 3	Secuencia	Tm
CR3_preF	5'-TGCACAAGCTCCTTATCAGATCACAG-3'	67°C
CR3_F	5'-ATTCTTGATTACAAGATTTCAACGTCATAC-3'	62°C
CR3_Cas9F1	5'-GTCTTTCTCAAAGCAAAGAACTTTATGATGC-3'	65°C
CR3_Cas9F2	5'-GATTTATTGCCGAAAGTATGAGAGA-3'	60°C
CR3_Cas9F3	5'-AGGTAAATGAGGAGACCGGCGAATC-3'	69°C
CR3_Cas9R1	5'-CCGCACCTTCAAATTCAGCCAATAG-3'	67°C
CR3_Cas9R2	5'-CATCATCTAATGTAGCCATCTCCGTG-3'	65°C
CR3_Cas9R3	5'-CCTTCTCTTCTGGCAAATACAAATC-3'	62°C
CR3_Cas9R4	5'-AGGACTACCTGGCAAAGACTTAACG-3'	67°C
CR3_Cas9R5	5'-GACGTGTTTCAACCAACTGGCG-3'	68°C
CR3_Cas9R6	5'-AAATACTAGCCAACATACGACGTGAACC-3'	67°C
CR3_Cas1F	5'-GGGTTAATGGCAGGTTGGAGAACAG-3'	68°C
CR3_Cas2F	5'-CTGCTGAAGAGAGGAAAGCGTATCG-3'	68°C
CR3_Csn2R	5'-ATCATTCAACTGGCTTACAATATCTGTG-3'	63°C
CR3_Cas1R	5'-TACAACCACAGACGACAACCTCACG-3'	69°C
CR3up-RC	5'-CGTTTTAGACAAGATGTGACTGTCACC-3'	66°C
CR3_up_R	5'-CGTAATCGCACTATTAATCTCAGCATGACTTC-3'	67°C

Tabla 12: cebadores utilizados

Cebador CRISPR 4	Secuencia	Tm
CR4_Cas2R1	5'-GATCCCAATGGAATTAAGACTTTTCTT-3'	61°C
CR4_Cas2R2	5'-ATAGTCGCCTCTCCTTCACCAACATTGTC-3'	71°C
CR4_Cas1R	5'-TCCTTCCCGTCCACGTAGTTGTTGC-3'	72°C
CR4_Cas5R	5'-ATCATCTGTATGGGAGAGGGCTACAAC-3'	68°C
CR4_Cas7R	5'-TGTA CTGGATGTGTGGAATGGCATG-3'	66°C
CR4_Cse2R	5'-GGCCATATTTCTGTTGCTTCACTCAAGG-3'	68°C
CR4_Cse1R	5'-CATCCGTTGGAAGCCGTGATTGAGG-3'	71°C
CR4_Cas3R1	5'-TAACTTGATGAATGTCAGGCCCGTC-3'	67°C
CR4_Cas3R2	5'-GCGCTTCCAGTATCACTATCCCAGG-3'	70°C
CR4_F	5'-AGAGCTATTAAATGAAGCATTGGAAG-3'	61°C
CR4_Cas3F1	5'-TCAGATGGATGGGAGCTTATGGTGTTC-3'	69°C
CR4_Cas3F2	5'-TGGTACACAGGTGCTTGAACAGTCG-3'	69°C
CR4_Cse1F1	5'-CGAAAGAAGATATTGCTGGAGATAA-3'	60°C
CR4_Cse1F2	5'-GGTGGTTGGGTTCCCTCGTATCAATG-3'	68°C
CR4_Cas7F1	5'-GCTCAGTATGGAGGAGTTAGAAGATC-3'	64°C
CR4_Cas7F2	5'-GCGGGTATGCTTGGAAGTGTGAG-3'	69°C
CR4_Cas5F	5'-AGACGCTGTATTTGTTGTAGCCCTC-3'	67°C
CR4_Cas1F	5'-AGTTCTGGATAGTAGAGGAACAGTTTCG-3'	66°C
CR4_Cas2F	5'-CTGTGAGATGCCCTTTACAGTAGTGAC-3'	67°C

Análisis de genomas virales

Objetivo

El objetivo es analizar y anotar los genomas de fagos aislados en Uruguay

Fundamento

El análisis de genomas fágicos permite encontrar diferencias y similitudes entre fagos autóctonos, así como con aquellos aislados previamente en otras partes del mundo. El genoma fágico es también una herramienta importante para la evaluación de la resistencia adquirida por parte de las BIMs generadas.

Protocolo

1. La secuenciación a partir de ADN fágico puro extraído mediante el protocolo correspondiente antes mencionado, fue llevada a cabo en un equipo ABI Prism 3100 Genetic Analyzer en el Centre Hospitalier de l'Université Laval en Quebec, Canadá.
2. El ensamblaje de la secuencia a partir de los *contigs* fue realizado usando el software Staden Package (<http://staden.sourceforge.net>).
3. El software Open Reading Frame Finder fue utilizado para buscar los potenciales genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).
4. Las proteínas hipotéticas fueron analizadas mediante BLASTP para determinar si se encontraban homólogos en la base de datos. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). También se analizaron con el software Compute pI/Mw para determinar su masa molecular y punto isoeléctrico (http://web.expasy.org/compute_pi/).
5. Todas las anotaciones y cálculo de contenido GC fueron realizadas en el software APE (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

Interpretación y observaciones

En caso de corroborar que la secuencia no se encuentre completa, deben diseñarse cebadores para obtener el fragmento faltante. Los extremos de los fagos tipo *cos* pueden localizarse buscando la región conservada de circularización (secuencia *cos*). En el caso de los fagos *pac*, los extremos deben localizarse mediante homología con otros fagos presentes en las bases de datos. En el caso de observarse grandes regiones en las que el software ORF Finder no ha localizado posibles genes, debe analizarse manualmente. El software ORF Finder, busca por defecto únicamente ORFs que comiencen con el codón ATG. Es importante buscar codones de inicio alternativos para todos los marcos abiertos de lectura.

Resultados y discusión

Optimización de técnicas de aislamiento y detección de bacteriófagos

La optimización de las técnicas de detección y aislamiento, se realizó sobre un pote de fermento comercial proporcionado por la empresa BIOMÁS S.A., del cual se sospechaba estaba contaminado con bacteriófagos. Las cepas puras que constituían el fermento comercial, formaban parte de la colección de cepas aportadas por la empresa BIOMÁS. Se realizaron ensayos de sensibilidad para cada una de estas cepas frente a la muestra del pote comercial. Las cepas en cuestión fueron la Uy01, Uy19 y Uy51 (ver tabla de cepas en el Anexo 1). La presencia de fagos se detectó por ensayos de recuento por la técnica de doble capa de agar (DCA) para las tres cepas por separado. Se obtuvieron playas de lisis para las tres cepas ensayadas (Figura 15). Las muestras del pote de fermento fueron tratadas como si se tratara de muestras de leche para obtener el filtrado libre de contaminantes (FLC).

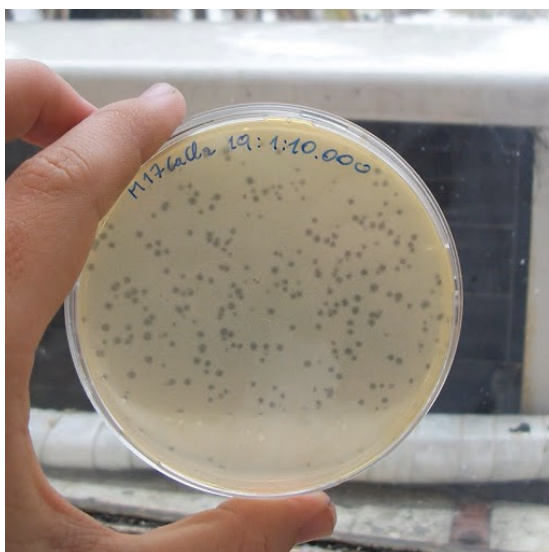


Figura 15: Recuento en placa de bacteriófagos. En la figura se observan los resultados de un ensayo de doble capa de agar utilizando la cepa Uy19 con una dilución 1:1000 del FLC obtenido el pote de fermento contaminado

A partir de las placas contables como la que se muestra en la Figura 15, se recuperaron playas aisladas a partir de las cuáles se obtuvieron poblaciones clonales de fagos. De esta forma se obtuvieron los primeros stocks de fagos purificados, que se utilizaron para la optimización de las técnicas moleculares de detección y cuantificación.

Detección de fagos por PCR

Uno de los objetivos planteados en este proyecto, fue la optimización de técnicas de detección moleculares, que permitieran identificar la presencia de fagos en muestras de plantas industriales, sin necesidad de realizar ensayos microbiológicos que implicaran demasiada manipulación y gasto de material. El primer acercamiento fue la optimización de técnicas de detección por PCR convencional, utilizando cebadores descritos en la literatura.

Método Host

El método Host (Binetti et al., 2005) se denomina de esta manera pues los cebadores utilizados están diseñados para amplificar una región del gen que codifica el anti receptor viral, o *host specificity protein* en inglés. Los amplicones obtenidos por este método, tienen un tamaño suficientemente grande (aproximadamente entre 600 y 800pb) como para ser secuenciados y así obtener confirmación de la naturaleza del virus.

Los primeros ensayos fueron llevados a cabo utilizando el fermento contaminado, al igual que en los ensayos de aislamiento y detección por el método microbiológico de doble capa de agar. Para el primer ensayo por PCR, se utilizó una muestra del fermento original, y una muestra de FLC obtenida del mismo. Los resultados permitieron detectar la presencia de fagos en ambas muestras, pero con la particularidad de la aparición de dos bandas diferentes en la reacción de amplificación para la muestra del fermento sin tratar, y una única banda en la muestra de FLC (Figura 16). Esta diferencia en los resultados esperados nos llevó a contemplar tres hipótesis diferentes: la primera es que hubieran dos fagos libres diferentes en la muestra original, la segunda es que se tratara de una amplificación inespecífica del genoma de las bacterias presentes en el fermento, y la tercera es que se tratara de un profago en alguna de las tres cepas. La primera hipótesis fue descartada ya que el FLC fue obtenido de la misma muestra de fermento utilizada para la reacción de amplificación directa por lo que si existían dos fagos éstos deberían estar presentes también en el FLC.

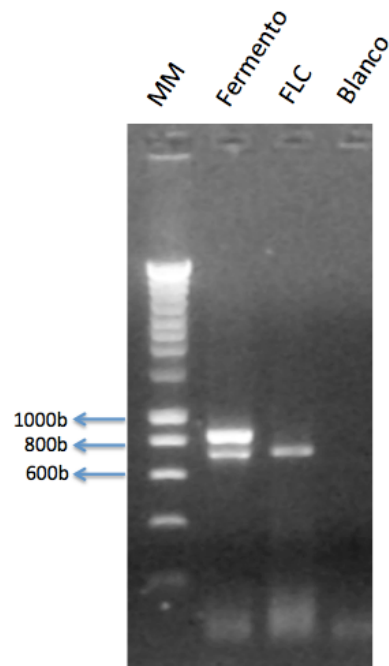


Figura 16: Resultados obtenidos de la amplificación por PCR del FLC del fermento y de una alícuota del fermento directo, utilizando los cebadores Host. En la figura se muestra una electroforesis en gel de agarosa 1,2%, en la que observan dos bandas para el FLC y una única para la playa aislada. MM: marcador molecular SmartLadder (Eurogentec)

Para probar las otras dos hipótesis, se realizaron ensayos de PCR utilizando ADN extraído de las tres cepas que componían el fermento. Los resultados mostraron un producto de PCR en la amplificación para la cepa Uy51, cuyo tamaño se corresponde con el de la banda presente en las reacciones para el fermento original y que está ausente en las reacciones para el FLC (Figura 17).

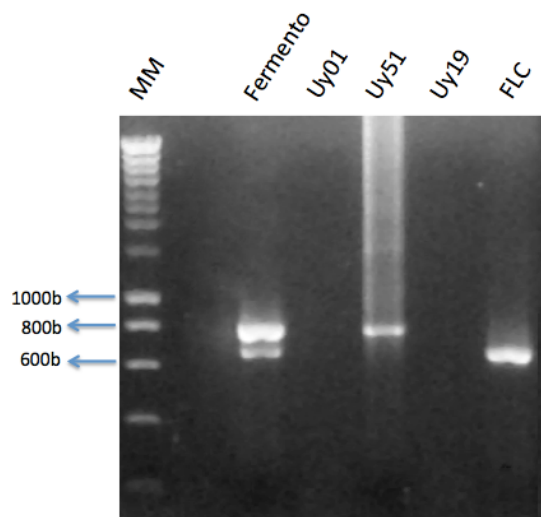


Figura 17: Amplificación por PCR de ADN bacteriano y controles. Los controles utilizados fueron una muestra de fermento y una del FLC. MM: marcador molecular SmartLadder (Eurogentec)

Habiendo determinado el origen de esta amplificación (ADN de la cepa Uy51), se envió a secuenciar la banda problema para determinar si se trataba de una amplificación inespecífica o de un profago. El análisis de las secuencias demostró que se trataba de un profago integrado en el genoma de Uy51 (Figura 18), por lo tanto esta cepa fue separada de la colección y no se volvió a utilizar en nuestros ensayos y se recomendó que tampoco fuera utilizada en producción. Se realizaron ensayos de inducción utilizando mitomicina C y condiciones de estrés mediante congelado y descongelado rápido a -20°C que demostraron que era posible inducir el ciclo lítico del profago y lisar el cultivo. Aún así, este fago obtenido no fue capaz de infectar a otras cepas de la colección.

Figura 18: Resultado del BLAST de la secuencia obtenida de la amplificación de ADN de Uy51 con los cebadores Host. En la figura se observa que los hits corresponden a bacteriófagos de *S. thermophilus*.

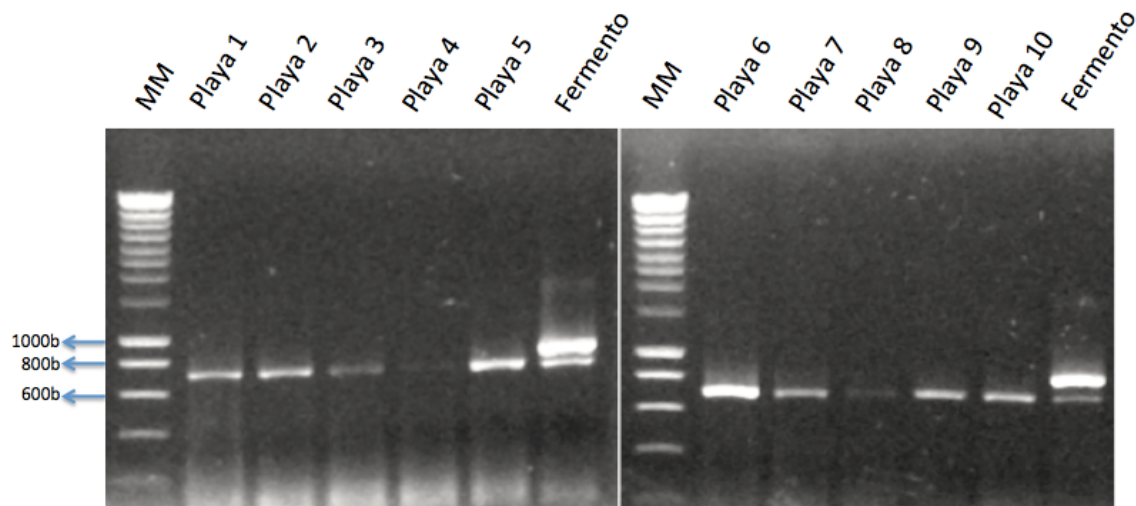


Figura 19: Amplicones obtenidos de 10 playas de lisis aisladas utilizando los cebadores Host. Se utilizó como control positivo una muestra de fermento. MM: marcador molecular SmartLadder (Eurogentec)

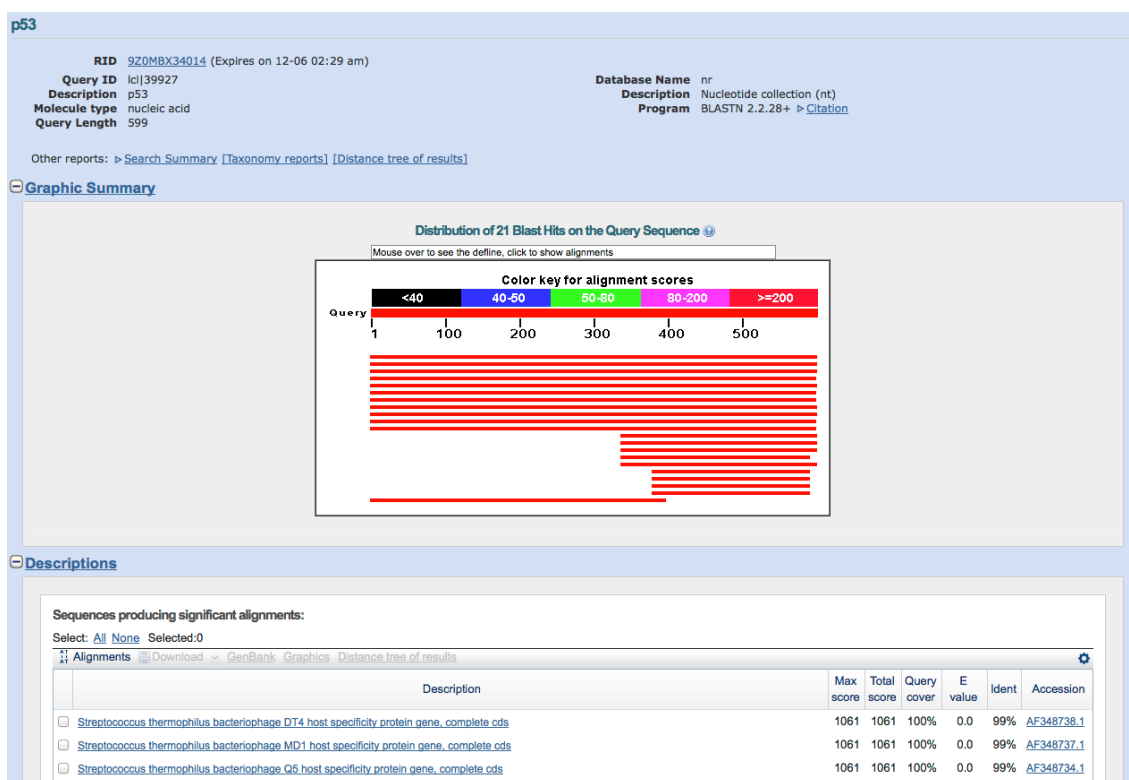


Figura 20: Resultado del BLAST de la secuencia obtenida de la amplificación de playas aisladas utilizando los cebadores Host. En la figura se observa que los hits corresponden a bacteriófagos de *S. thermophilus*.

Subsecuentes ensayos de detección utilizando esta técnica fueron llevados a cabo para 16 muestras industriales de suero. Los resultados de estos ensayos

detectaron la presencia de fagos lo que confirmó la utilidad de esta técnica para la detección de fagos contaminantes en muestras industriales (Figura 21).

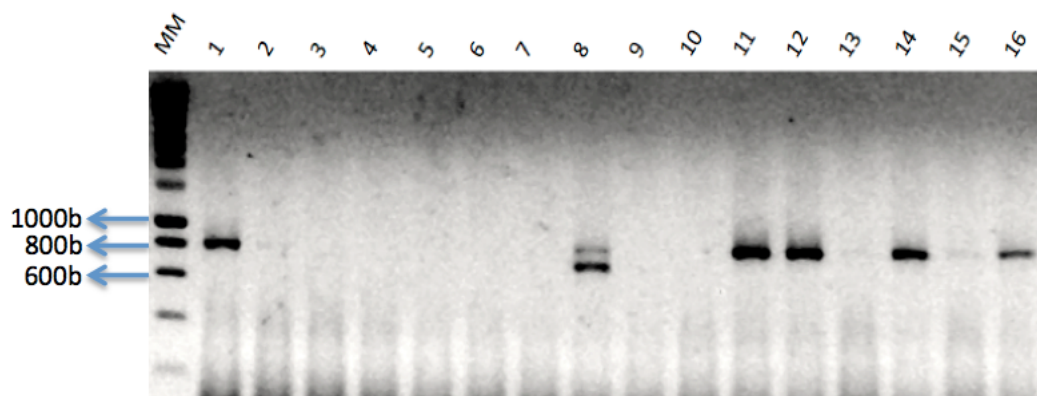


Figura 21: Amplificaciones realizadas con los cebadores Host a 16 muestras de suero provenientes de industrias queseras. MM: marcador molecular SmartLadder (Eurogentec)

Limitaciones observadas

Si bien el uso de la PCR convencional fue utilizada como método de detección en las primeras etapas del trabajo, una vez optimizadas las técnicas de real time PCR (qPCR) para detección y cuantificación, este método fue únicamente utilizado para confirmar la naturaleza de los fagos aislados mediante secuenciación. Sin embargo, durante la realización de un ensayo de confirmación de naturaleza sobre playas de lisis para potenciales nuevos fagos aislados (Figura 22), observamos que estos eran indetectables utilizando esta técnica de PCR (Figura 23). Estos resultados demostraron que esta técnica no es 100% confiable por lo que no debe ser utilizada como único método de detección, ya que podría dar falsos negativos. Aún así, teniendo en cuenta esta limitación, es una herramienta muy útil para la confirmación de la naturaleza de los fagos aislados. Además, posee la ventaja sobre la técnica de qPCR, que puede identificar en una muestra la presencia de más de un fago simultáneamente, lo cual no es posible utilizando las técnicas de qPCR, a menos que estos pertenezcan a grupos diferentes (*cos* o *pac*).

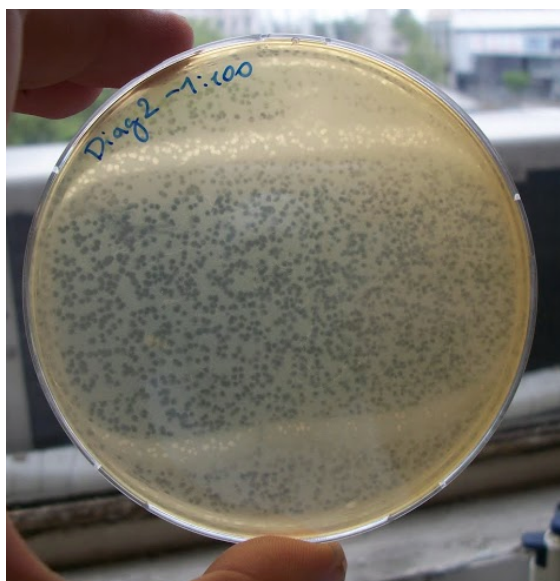


Figura 22: Recuento en placa del fago $\phi 73$. En esta figura podemos observar playas aisladas del fago $\phi 73$, uno de los dos fagos que no pudieron detectarse utilizando la técnica de PCR con cebadores Host.

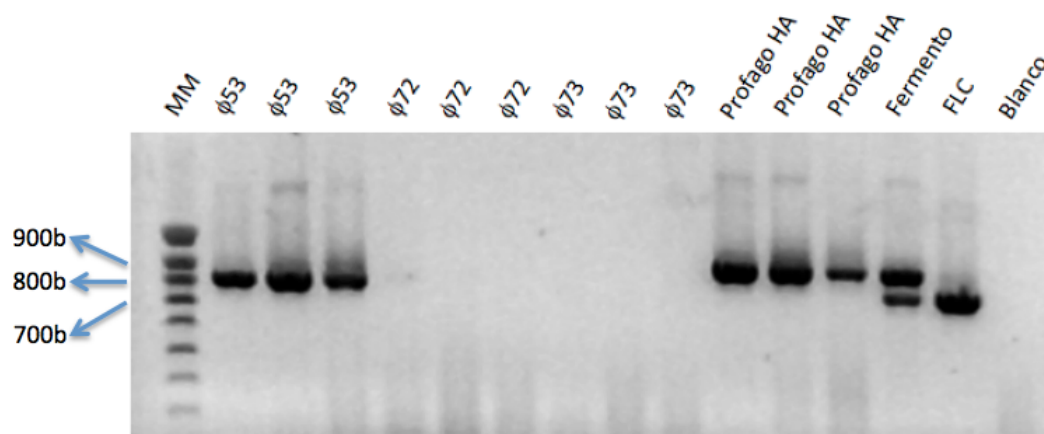


Figura 23: Amplificaciones por PCR de fagos utilizando cebadores Host. En la figura es posible apreciar que tanto el fago $\phi 72$ como el $\phi 73$ no son detectables por este método, lo que significa una limitación de la técnica. MM: marcador molecular SmartLadder SF (Eurogentec)

Método multiplex

Otra de las limitaciones del método de detección usando los cebadores Host, es que no es posible determinar el tipo de empaquetamiento del ADN fágico. Estos bacteriófagos se dividen en dos grandes grupos de acuerdo al mecanismo de empaquetamiento de su genoma, los tipo *cos* y los tipo *pac* (Hernández Magadán, 2007). El determinar a qué grupo pertenecen los fagos, es un paso importante en la caracterización, por lo que se decidió utilizar un set de cebadores diferente

diseñado para revelar la naturaleza de los virus aislados mediante amplificación por PCR (Quiberoni et al., 2006). Para fagos tipo *cos*, se espera un amplicón de una banda de aproximadamente 147pb, mientras que para los fagos *pac*, la banda esperada es de aproximadamente 427pb.

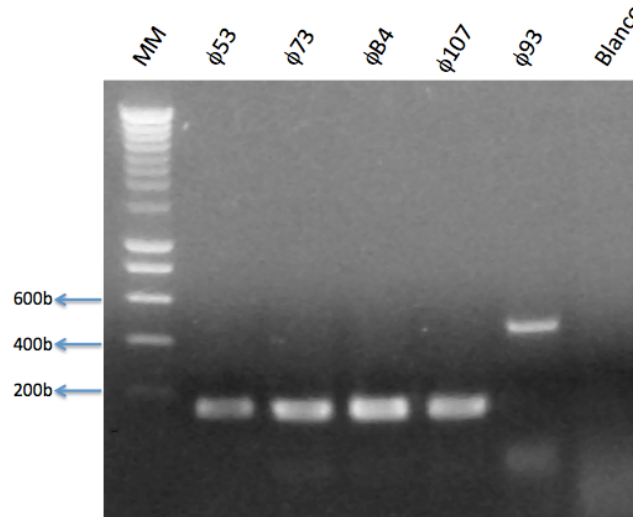


Figura 24: Amplificación por PCR multiplex de fagos aislados. Se observa que todos los fagos pertenecen al grupo *cos* excepto φ93, que pertenece al grupo PAC. MM: marcador molecular SmartLadder (Eurogentec)

En la Figura 24 se muestran los resultados de amplificación para algunos fagos aislados. Esta técnica se utilizó mayormente en las primeras etapas del proyecto, antes de optimizar totalmente las técnicas basadas en qPCR, las cuales permiten identificar el sistema de empaquetamiento del virus durante la amplificación. Sin embargo la multiplex PCR resultó ser una técnica confiable a la hora de determinar si un fago pertenecía al tipo *cos* o al tipo *pac*.

Detección y cuantificación de bacteriófagos por qPCR

A partir del primer fago aislado se realizó la construcción de una curva estándar de titulación por qPCR. Optimizar las técnicas de qPCR permitió la cuantificación simultánea con la detección, redundando en mayor velocidad en el análisis de las muestras y menor manipulación evitando posibles contaminaciones. Se utilizó el método descrito en 2008 por del Río et al., que discrimina entre fagos *cos* y *pac*, utilizando cebadores específicos y sondas de hibridación para cada tipo de fagos. En este trabajo ajustamos el protocolo usando la tecnología SYBR Green y compararamos ambos métodos. Evaluamos el uso de SYBR Green por constituir una alternativa más económica, facilitando así la transferencia a la industria. Dado que la ventaja del uso de sondas de hibridación es su mayor especificidad, para garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos mediante SYBR Green, consideramos esencial determinar el punto de *fusión* para la secuencia amplificada. Los resultados falsos positivos pueden descartarse, si se verifica que el pico de *fusión* de la muestra problema coincide con el del control positivo.

Optimización del método utilizado SYBR Green

El primer paso consistió en titular un stock de $\phi 53$ mediante recuento en placa, y realizar diluciones en agua obteniéndose una curva de cuatro puntos. El stock inicial titulado, se estandarizó mediante diluciones a una concentración de $1,0 \times 10^9$ ufp/ml. Las diluciones realizadas por debajo de la dilución -6 (menos de una partícula fágica por μ l), no mostraron amplificación, lo cual era esperado (Tabla 13, Figuras 25 y 26).

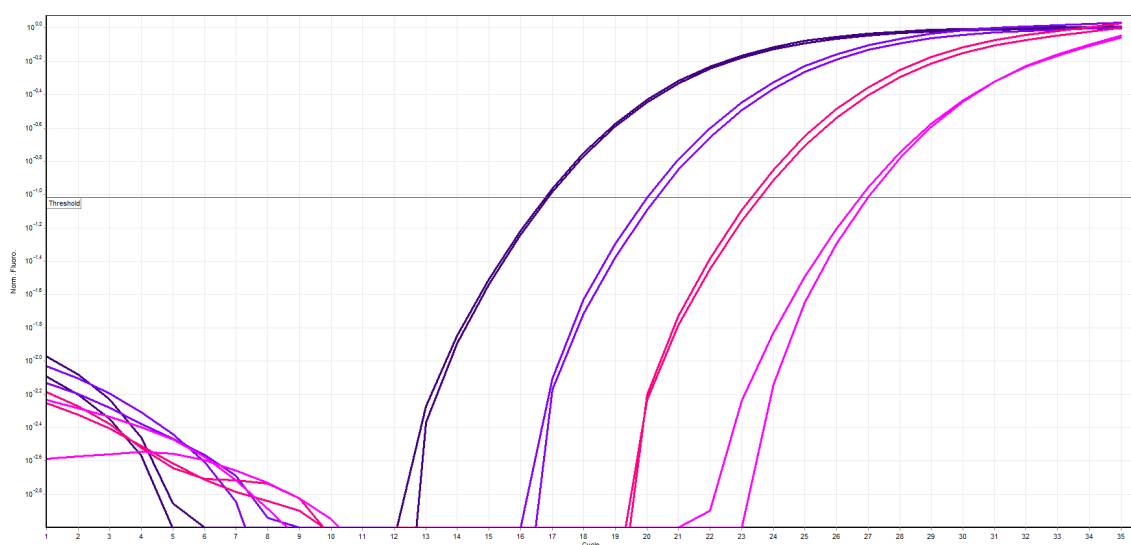


Figura 25: Curva estándar para fagos tipo *cos*, utilizando diluciones de concentración conocida del fago $\phi 53$ en agua.

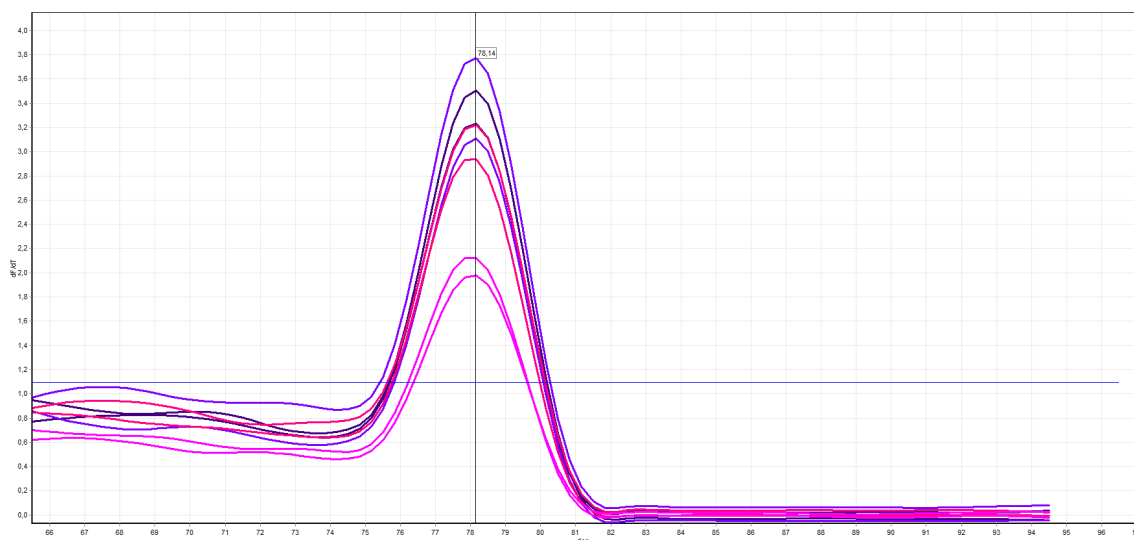


Figura 26: Curva de fusión para fagos tipo *cos*, utilizando diluciones de concentración conocida del fago $\phi 53$ en agua. Se observa que el pico para esta secuencia es de aproximadamente 78°C.

Tabla 13: títulos virales de las diluciones utilizadas en el ensayo de optimización de qPCR

Stock diluido en agua	Concentración (en partículas por ml)
Stock dil -3	1.000.000
Stock dil -4	100.000
Stock dil -5	10.000
Stock dil -6	1.000

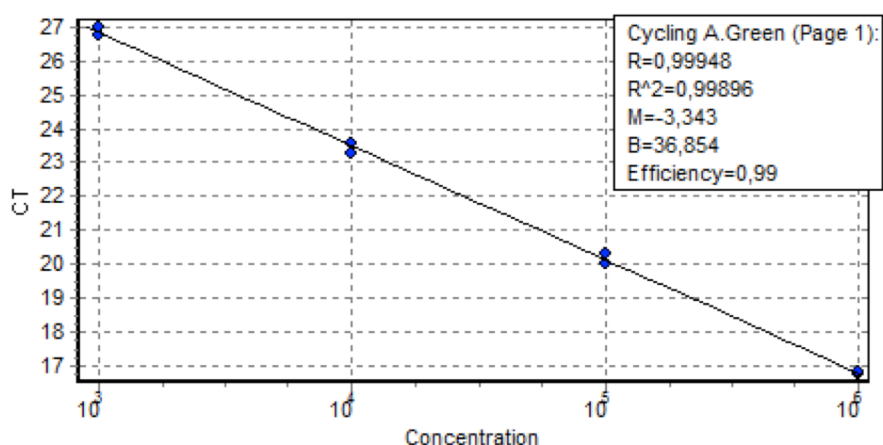


Figura 27: Eficiencia de la reacción calculada de forma automática por el software del equipo.

El siguiente paso fue titular muestras diluidas en suero de leche y leche, para verificar si el método es aplicable para estas matrices. Se comprobó que las

muestras de suero no presentan desviaciones con respecto al uso de agua como solvente (Figura 28, Tabla 14), mientras que las muestras con leche presentaban muchos errores (Figura 29, Tabla 15). La leche utilizada para estos ensayos fue leche en polvo descremada reconstituida al 10%, de forma de obtener una leche similar a la fresca, según especificación del fabricante. El suero estéril fue obtenido mediante acidificación de leche en polvo reconstituida al 10% utilizando ácido láctico hasta alcanzar el punto de sinéresis; la fase acuosa posteriormente fue centrifugada para alminar restos sólidos y filtrada utilizando filtros de 0,22µm. Al diluir las muestras de leche al décimo, los valores fueron comparables a los de la curva (Figura 30, Tabla 16). Estos resultados fueron obtenidos realizando las diluciones de los stocks en leche en polvo descremada reconstituida al 1%. Es por esto, que se establecieron como límites de detección para la técnica utilizando la curva estándar obtenida para las diluciones en agua 10³ ufp/ml para muestras de suero y 10⁴ ufp/ml para muestras de leche. El pico de fusión para esta reacción es aproximadamente 78°C, el valor de fluorescencia umbral 0,096, y la eficiencia 99% (Figura 27).

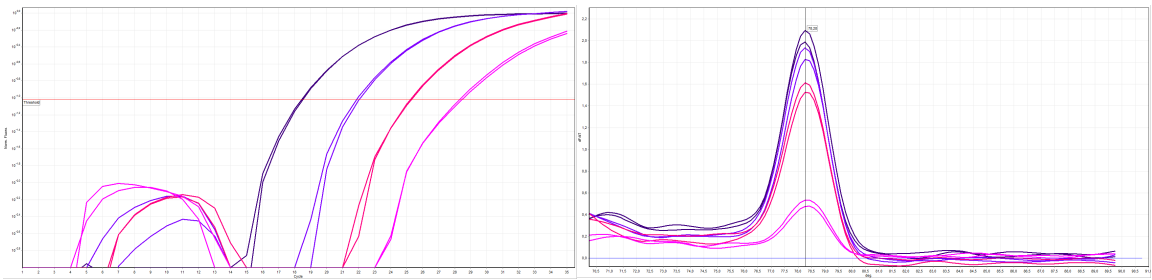


Figura 28: curvas de amplificación y fusión para diluciones del fago ϕ 53 utilizando suero como solvente

Tabla 14: títulos virales calculados por el software utilizando suero de leche como solvente

Stock diluido en suero estéril	Concentración esperada (copias por ml)	Concentración obtenida (copias por ml)
Stock dil -3	1.000.000	1.104.218
Stock dil -4	100.000	109.070
Stock dil -5	10.000	10.222
Stock dil -6	1.000	1.195

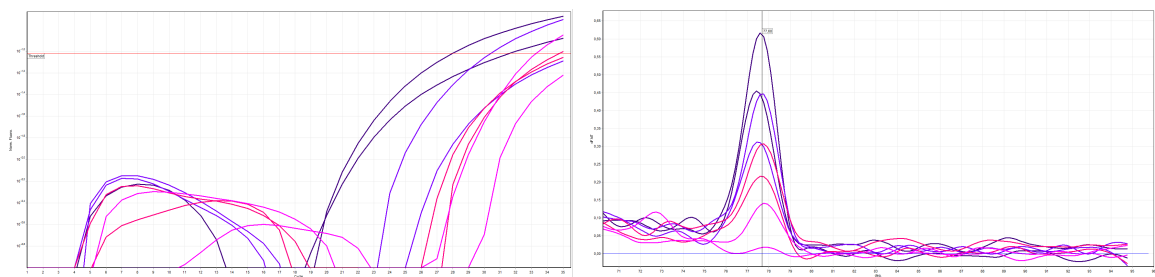


Figura 29: curvas de amplificación y fusión para diluciones del fago $\phi 53$ utilizando leche 10% como solvente

Tabla 15: títulos virales calculados por el software utilizando leche 10% como solvente

Stock diluido en leche 10% estéril	Concentración esperada (copias por ml)	Concentración obtenida (copias por ml)
Stock dil -3	1.000.000	$<10^3$
Stock dil -4	100.000	$<10^3$
Stock dil -5	10.000	$<10^3$
Stock dil -6	1.000	$<10^3$

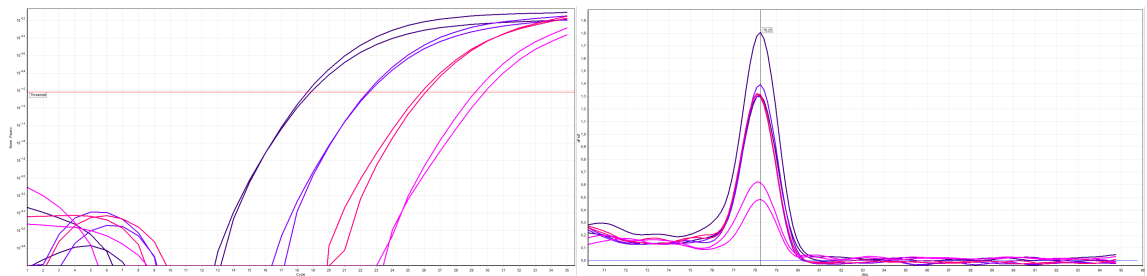


Figura 30: curvas de amplificación y fusión para diluciones del fago $\phi 53$ utilizando leche 1% como solvente

Tabla 16: títulos virales calculados por el software utilizando leche 1% como solvente

Stock diluido en leche 1% estéril	Concentración esperada (copias por ml)	Concentración obtenida (copias por ml)
Stock dil -3	1.000.000	1.307.901
Stock dil -4	100.000	101.362
Stock dil -5	10.000	9.068
Stock dil -6	1.000	962

Esta curva (Figura 25) fue realizada para fagos *cos* en primera instancia ya que al momento no se había logrado aislar ningún fago tipo *pac*. Una vez aislado el fago *pac* $\phi 93$, se intentó ver si la misma curva se ajustaba para titular este tipo de fagos. Para esto se construyó una curva estándar a partir de un stock titulado por DCA, y se compararon los resultados de la titulación utilizando una y otra curva. El título stock de partida del fago $\phi 93$ fue $1,5 \times 10^7$ ufp/ml, y las diluciones fueron llevadas a cabo directamente en suero estéril (Figuras 31, 32 y 33).

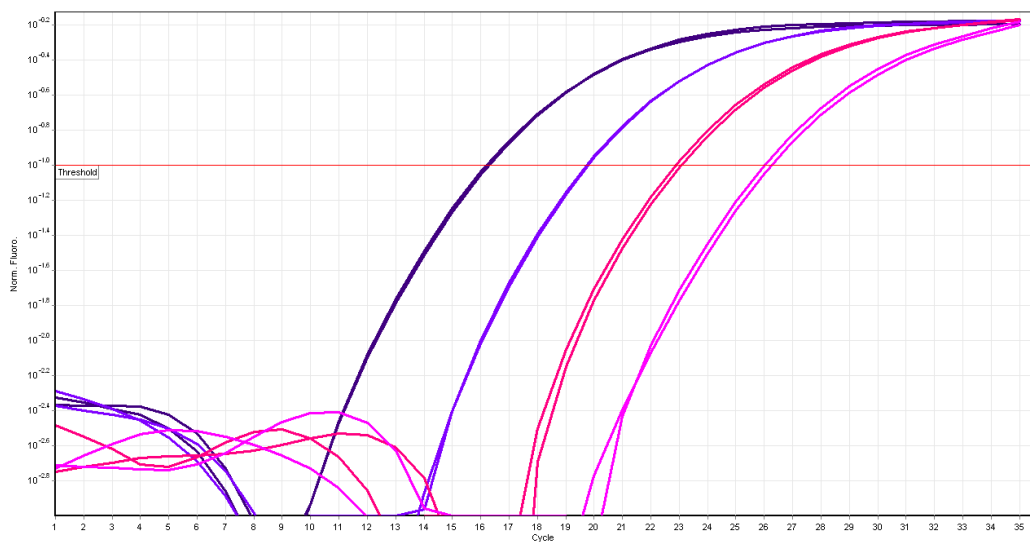


Figura 31: Curva estándar para fagos tipo *pac* utilizando diluciones de concentración conocida del fago $\phi 93$ en suero de leche estéril.

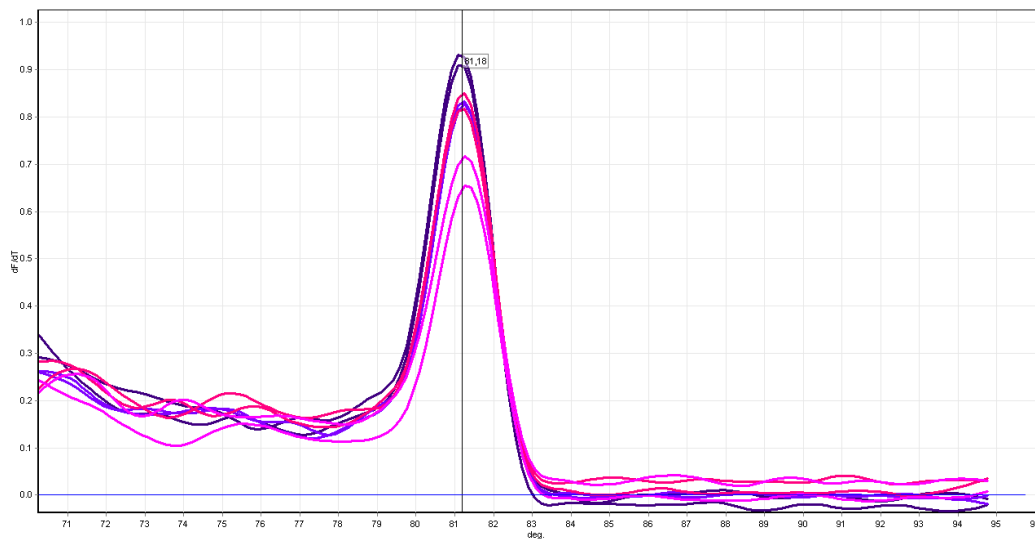


Figura 32: Curva de fusión para fagos tipo *pac*, utilizando diluciones de concentración conocida del fago $\phi 93$ en suero. Se observa que el pico para esta secuencia es de aproximadamente 81°C.

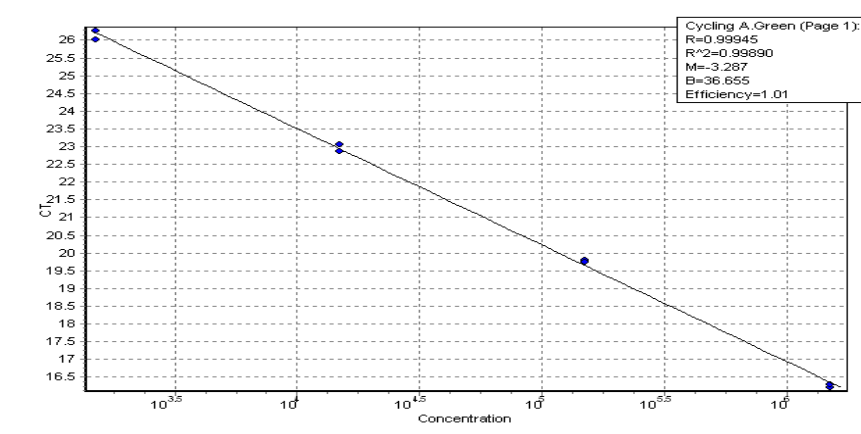


Figura 33: Eficiencia de la reacción calculada de forma automática por el software del equipo.

Como puede observarse en la Figura 33, la curva mostró una eficiencia similar a la construida para fagos *cos* (99%) y un valor de fluorescencia umbral de 0,1. El pico de fusión para este tipo de fagos, fue de aproximadamente 81°C, lo que muestra una diferencia entre ambos tipos de fagos (Figura 32).

El siguiente paso, fue verificar si existía un comportamiento similar al observado en las reacciones para fagos *cos*, con respecto a la titulación en muestras de leche. Los resultados detallados a continuación muestran los mismos errores observados en la amplificación (Figuras 34 y 35, Tablas 17 y 18).

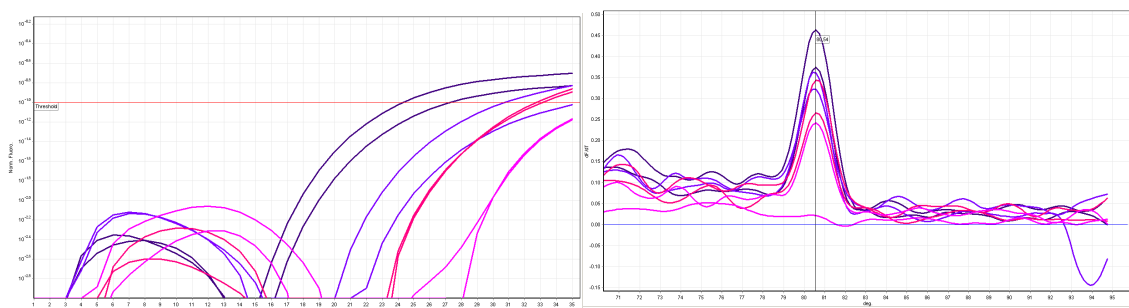


Figura 34: curvas de amplificación y *fusión* para diluciones del fago $\phi 93$ utilizando leche 10% como solvente

Tabla 17: títulos virales calculados por el software utilizando leche 10% como solvente

Stock diluido en leche 10% estéril	Concentración esperada (copias por ml)	Concentración obtenida (copias por ml)
Stock dil -1	1.500.000	1.966
Stock dil -2	150.000	<10 ³
Stock dil -3	15.000	<10 ³
Stock dil -4	1.500	<10 ³

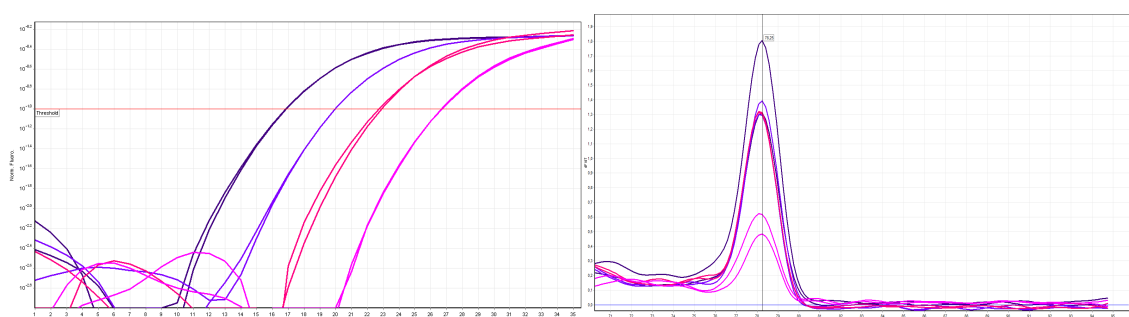


Figura 35: curvas de amplificación y fusión para diluciones del fago $\phi 93$ utilizando leche 1% como solvente

Tabla 18: títulos virales calculados por el software utilizando leche 1% como solvente

Stock diluido en leche 1% estéril	Concentración esperada (copias por ml)	Concentración obtenida (copias por ml)
Stock dil -1	1.500.000	1.048.661
Stock dil -2	150.000	117.740
Stock dil -3	15.000	16.187
Stock dil -4	1.500	1.071

Por último, se compararon los valores de titulación obtenidos para fagos *pac* con la curva obtenida para fagos *cos* con los valores esperados, para probar si es posible una única curva para realizar ensayos de titulación para ambos tipos de fagos. Los resultados están detallados en las Tablas 19 y 20.

Tabla 19: titulación de fagos *pac* en suero, utilizando la curva para fagos *cos*

Stock diluido suero estéril	Concentración esperada (copias por ml)	Concentración obtenida con curva <i>cos</i> (copias por ml)
Stock dil -1	1.500.000	1.551.303
Stock dil -2	150.000	137.598
Stock dil -3	15.000	15.141
Stock dil -4	1.500	1.707

Tabla 20: titulación de fagos *pac* en leche 1%, utilizando la curva para fagos *cos*

Stock diluido en leche 1% estéril	Concentración esperada (copias por ml)	Concentración obtenida con curva <i>cos</i> (copias por ml)
Stock dil -1	1.500.000	1.024.253
Stock dil -2	150.000	119.221
Stock dil -3	15.000	16.924
Stock dil -4	1.500	1.174

De estos ensayos podemos concluir en primer lugar que el comportamiento de los fagos *pac* es similar al observado para los fagos *cos* frente a los diferentes solventes. En segundo lugar, las curvas de calibración obtenidas con el software son sumamente similares y presentan la misma eficiencia. Al titular muestras de fagos *pac* con la curva obtenida específicamente para ellos y con la obtenida para fagos *cos*, los resultados son equivalentes y las diferencias se encuentran dentro del error del software. Es por esto, que concluimos que puede usarse cualquiera de las curvas de manera indistinta para titular muestras con fagos *cos* y *pac*.

Comparación entre métodos de qPCR utilizando SYBR Green y sondas

Para comparar cual de estos dos métodos funcionaba mejor con nuestras condiciones de trabajo y equipos, se sintetizaron sondas de hibridación utilizando las secuencias descritas en la literatura (del Rio et al., 2008). Las sondas se marcaron con dos fluoróforos diferentes, FAM para la sonda *cos* el cual emite fluorescencia de longitud de onda verde, y HEX para la sonda *pac*, el cual emite

fluorescencia de longitud de onda amarilla. El detalle de las sondas se explica en materiales y métodos.

El experimento consistió en realizar ensayos de cuantificación en suero, leche y leche diluida al décimo utilizando los mismos stocks que para los ensayos con SYBR Green. El objetivo fue comparar las eficiencias de las reacciones para determinar si el uso de sondas significaba una mejora sobre el método ajustado con SYBR Green.

Los resultados obtenidos de estos ensayos mostraron que, en primer lugar, en el método utilizado con sondas no fue posible detectar la presencia de fagos en muestras de leche concentrada, a diferencia del método que emplea SYBR Green. En segundo lugar, las eficiencias de las reacciones fue variada. Para el caso de fagos *pac*, los resultados fueron sumamente satisfactorios, obteniéndose eficiencias del 99% (Figura 37 C y D) tanto para el suero como para la leche diluida. Para el caso de fagos *cos*, los resultados obtenidos con sondas no fueron tan bueno como los obtenidos usando SYBR Green. La eficiencia para suero fue de 82% (Figura 36 C), mientras que para leche diluida fue de 81% (Figura 36 D).

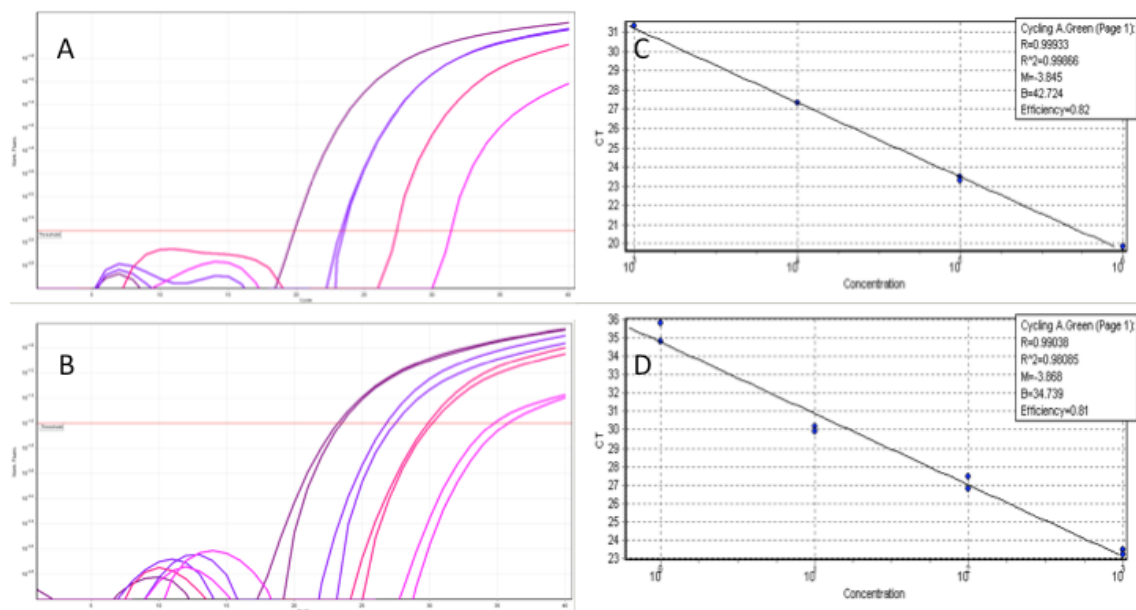


Figura 36: Ensayos de cuantificación de fagos *cos* utilizando una sonda específica de amplificación. A: Curva de amplificación en suero, B: curva de amplificación en leche 1%, C: eficiencia de la reacción en suero, D: eficiencia e la reacción en leche 1%.

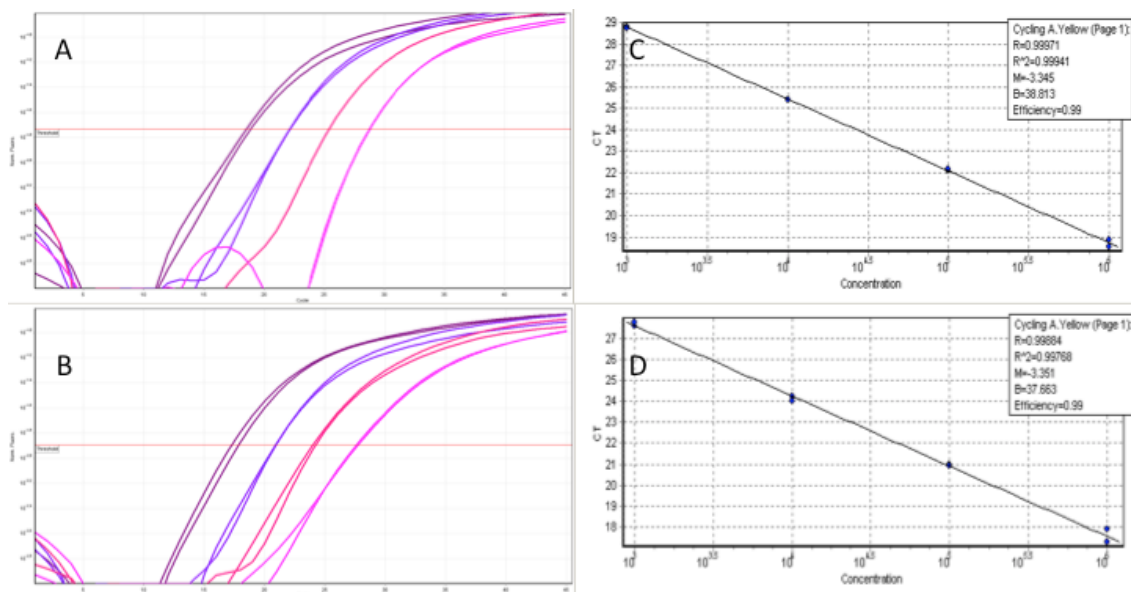


Figura 37: Ensayos de cuantificación de fagos *pac* utilizando una sonda específica de amplificación. A: Curva de amplificación en suero, B: curva de amplificación en leche 1%, C: eficiencia de la reacción en suero, D: eficiencia de la reacción en leche 1%.

Los resultados obtenidos demostraron que, para el sistema de sondas y cebadores utilizados, nuestras condiciones de trabajo y equipos, el uso de SYBR Green como tecnología de qPCR era una alternativa mejor que el uso de sondas de hibridación, no solamente por su menor costo, sino porque además se obtuvieron amplificaciones más eficientes.

Una ventaja del uso de sondas sobre SYBR Green, es la posibilidad de realizar reacciones de amplificación multiplex para cuantificar simultáneamente fagos *cos* y *pac* en un mismo tubo, sin necesidad de preparar dos mezclas de reacción diferentes. Los resultados obtenidos para la reacción de multiplex fueron similares a los obtenidos para las dos mezclas por separado, con la desventaja de que para poder alcanzar los niveles de eficiencia esperados, el volumen mínimo de reacción a utilizar fue de 25 μ l. Esto implica que, por cada reacción se debe utilizar más del doble de reactivos que para una reacción de amplificación simple de 10 μ l, lo que se traduce en mayores costos que los que se tienen al realizar dos reacciones por separado. Por lo tanto, la cuantificación por este método resulta la más costosa de las opciones, lo que la hace menos atractiva para su uso o transferencia a nivel de industria.

Estudio de muestras proporcionadas por la industria

Fueron analizadas un total de 432 muestras, de las cuales 10 correspondieron a potes de fermento, y 422 a muestras de plantas de elaboración de queso nacionales. De estas muestras, 62 fueron recolectadas durante la realización de estudios de intervención y seguimiento (uno de estos se detalla más adelante en el apartado Ensayo de seguimiento en la planta “A”), 102 fueron muestras de leche pre fermentación, de distintos puntos del proceso (silo, pasteurizador, tina, etc.) y 258 fueron muestras de suero post fermentación (ver tabla de muestras en el Anexo 2).

La naturaleza de los muestreos fue variada. La mayoría de las muestras fueron recolectadas cuando se presentó un problema en planta, pero no necesariamente en el momento o tina exactos. Estas muestras se denominaron muestras con *información incompleta*. Se trata de muestras tomadas sin seguir un criterio claro, o en las que no se informó su naturaleza. Por ejemplo, se observó un problema en la planta en determinado momento, pero no se recolectaron muestras inmediatamente, sino que se realizaron los muestreos posteriormente y luego se enviaron las muestras. Entre estas muestras, pueden encontrarse muestras de fermentaciones fallidas, lentas o normales, sin discriminación, y el productor no proporcionó la información de la naturaleza real de las mismas. El objetivo de analizar estas muestras, fue encontrar bacteriófagos en ambientes donde se detectó algún problema durante el proceso.

Otras muestras sin embargo, fueron recolectadas al momento de observar el problema, y se informó al respecto. Estas muestras se denominaron con *información completa*. Estas muestras, permitieron, además de aislar posibles fagos, identificar en tiempo real si el problema observado se encontraba asociado a un ataque viral.

Del total de 258 muestras de suero analizadas, 221 son muestras con *información incompleta*. De estas 221, 122 dieron positivo al análisis por qPCR para bacteriófagos, lo que representa un 55% de muestras contaminadas del total de muestras con información incompleta analizadas.

Las restantes 37 muestras, son de *información completa*. De éstas, 29 resultaron positivas para los análisis de búsqueda de bacteriófagos, lo que representa un 78% de positivos. Esto quiere decir que en casi el 80% de los casos en que se reportaron fallas de producción, el problema pudo estar asociado a ataques virales.

El análisis de potes de fermento, fue llevado a cabo en casos que se sospechó que fueran la fuente de contaminación en la planta. De los 10 potes de fermento analizados, tres dieron resultado positivo para bacteriófagos, pudiéndose aislar virus de dos de ellos.

De las 102 muestras de leche analizadas, únicamente 18 dieron resultados positivos para los ensayos de qPCR. Esto quiere decir que únicamente el 18% de las muestras poseían un título igual o mayor a 10^4 ufp/ml. Los detalles de estos resultados se encuentran en el Anexo 2.

En la mayoría de las muestras provenientes del proceso en planta recolectadas previo o posteriormente a la fermentación en las que se detectaron fagos, los niveles de fagos encontrados en la leche pre fermentación no superaron 10^4 ufp/ml. Esto quiere decir, que en la mayoría de los casos, o los niveles de contaminación en la leche usada como materia prima estaban por debajo del límite de detección de la técnica, o la fuente de contaminación era de un origen diferente. Este es el caso del ensayo de seguimiento realizado en la planta de producción “A”. Este ensayo de seguimiento permitió situar el foco de infección en otro punto del proceso diferente a la leche cruda.

Ensayo de seguimiento en la planta “A”

El ensayo de seguimiento en la planta “A” fue llevado a cabo una vez que el productor informara de problemas de producción. Se realizó un primer muestreo de sueros el mismo día en que los problemas surgieran, y fueron analizados al día siguiente, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 38.

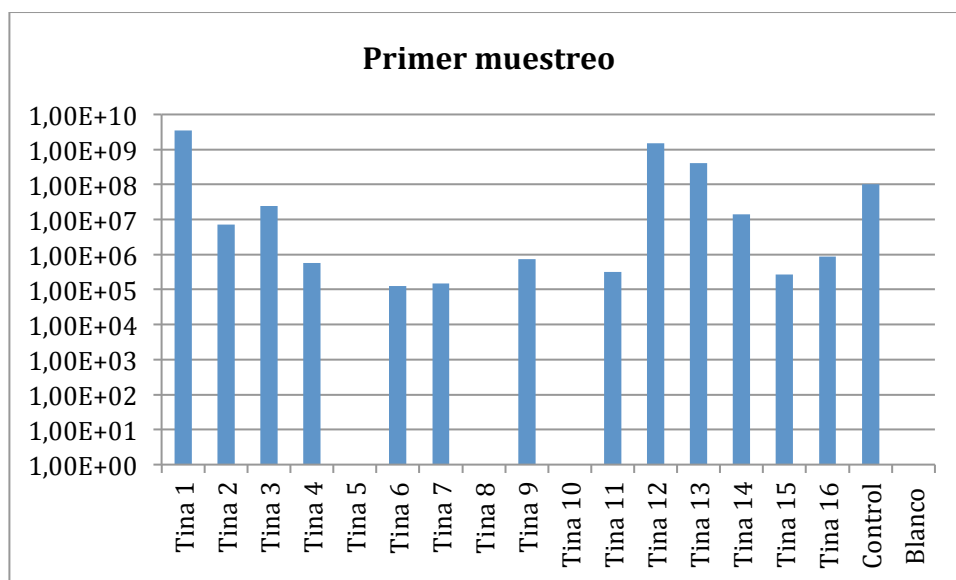


Figura 38: Títulos virales obtenidos mediante qPCR de muestras industriales

Los resultados de este primer análisis, mostraron contaminación por fagos en prácticamente todas las tinas, algunas incluso con títulos sumamente elevados.

El paso siguiente, fue realizar un muestreo y análisis de la leche presente en los silos y de los tambos que remitieron la misma, para intentar determinar el origen de la contaminación en la planta. Los resultados de este segundo análisis se muestran en la Figura 39.

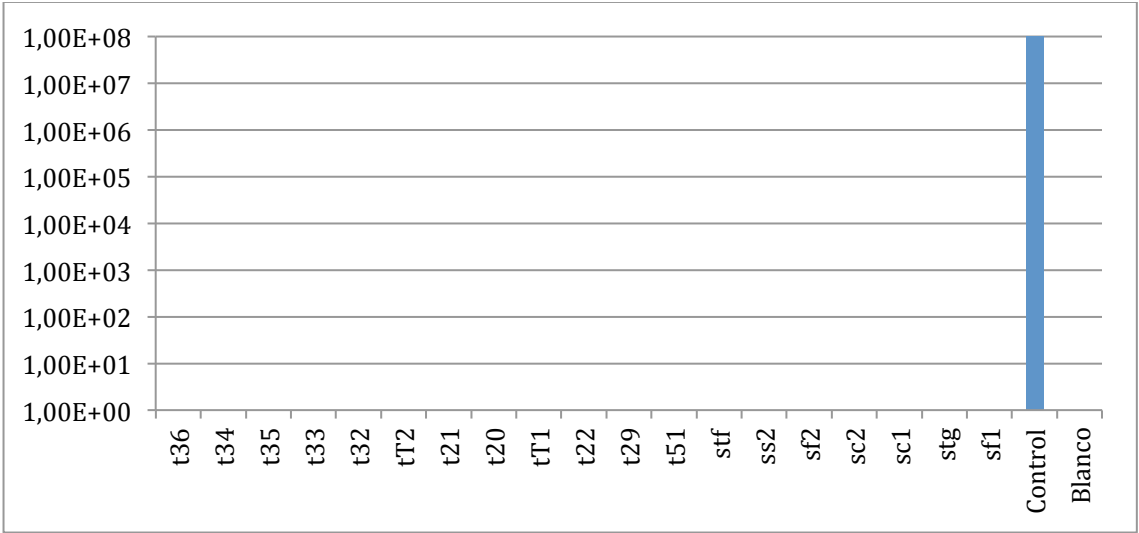


Figura 39: Títulos virales obtenidos de muestras de leche de tambos y silos

Este análisis resultó negativo para la presencia de fagos en todas las muestras. Según el consenso establecido en el trabajo de Neve y colaboradores en 1991, un nivel inicial de fagos en la leche inferior a 10^5 ufp/ml no debería ocasionar problemas visibles de producción (Neve et al., 1991), a pesar de observarse ataque en el análisis de qPCR. Si bien esto no garantizaba que el foco de infección no estuviera en la leche, se decidió realizar muestreos en distintos puntos de la planta (mangueras, pasteurizador mesadas, tanques, hiladora y descremadora) encontrándose un elevado título en la descremadora.

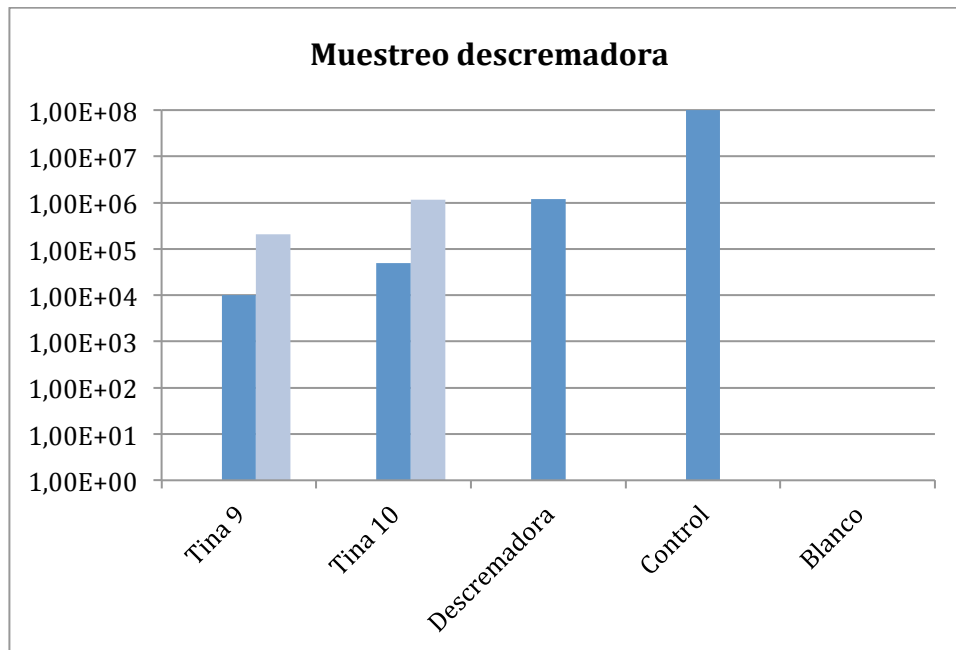


Figura 40: segundo muestreo de tinas y descremadora. En las muestras obtenidas de la tina 9 y 10, en azul oscuro se representa el título inicial de fagos antes de comenzar la fermentación y después de agregar grasa de la descremadora. En celeste se representa el título viral después de transcurrido el tiempo de fermentación.

La descremadora es utilizada para remover grasa del suero. Al realizar el muestreo se observó que una vez finalizada la fermentación, la grasa se reciclaba, reintroduciendo la misma en subsiguientes fermentaciones. Esto significaba, que en cada nueva fermentación la leche estaba siendo inoculada con potenciales fagos, provenientes de esta grasa. O sea, que al reciclar la grasa sobrante en una fermentación, se estaba generando un concentrado viral en la descremadora, convirtiéndola en un foco de infección. Junto con el muestreo de la descremadora, se realizó el mismo día un muestreo en dos tinas, antes de agregar la grasa, después de agregada la grasa y después de la fermentación. Los resultados (Figura 40) fueron concluyentes en mostrar el impacto del agregado de la grasa contaminada previo a la fermentación.

Este ensayo de seguimiento, permitió detectar el foco de infección dentro de la planta, solucionando el problema en corto tiempo y reduciendo potenciales pérdidas a la empresa.

Aislamiento y caracterización de bacteriófagos a partir de muestras industriales

Debido al gran volumen de muestras a analizar y a la duración prevista para este trabajo, debieron establecerse algunos criterios de selección de las muestras en las que se realizaría el aislamiento de fagos. En primer lugar, se dio prioridad a aquellas muestras que presentaron un título muy alto de fagos. Este criterio también dependió de la cantidad puntual de muestras a analizar en un mismo día y del modelo que será descrito a continuación. En segundo lugar, se eligieron aquellas muestras que hubieran generado problemas en las fermentaciones en planta y cuyas cepas bacterianas estuvieran en nuestra colección. Dado que muchas muestras provenían de fermentaciones realizadas con fermentos de otras empresas, o con lotes de fermentos de la empresa Biomás, de los cuales nosotros no contábamos con la información de las cepas que contenían. Este mismo criterio se aplicó a las muestras de leche pre fermentación. En tercer lugar, aquellas muestras de las que contábamos además, con muestras de leche pre fermentación de la misma tina y no se observaban diferencias en el título viral que evidenciaran un ataque fágico, tampoco fueron tomadas en cuenta en esta instancia (explicado más adelante en el modelo). Por último, aquellas muestras provenientes del mismo lugar, el mismo día y con los mismos lotes de fermento, fueron consideradas como una única muestra a la hora de intentar aislar bacteriófagos. Aquellas muestras que no fueron seleccionadas para aislamiento, se conservaron congeladas a -20°C .

Para el primer y tercer criterio, se realizó una simplificación matemática que permitiera tomar mejores decisiones a la hora de identificar un ataque por fagos.

Como identificar un ataque por fagos: simplificación matemática

En muchos casos, en los ensayos de qPCR, se hizo difícil identificar si un resultado positivo en una muestra evidenciaba un ataque viral. Esto fue debido a varios factores, como por ejemplo, la falta de información proporcionada por el productor, el no proporcionar una muestra pre fermentación para analizar, o factores asociados a las interacciones dentro de la tina. Es por esto, que se diseñó un modelo matemático sencillo que permitiera comprender a grandes rasgos, la relación fago-bacteria durante la fermentación.

En este modelo, fue necesario realizar varias asunciones respecto al crecimiento bacteriano, multiplicación viral e interacciones:

- La eficiencia de multiplicación bacteriana es 100%. Esto quiere decir, que en cada intervalo, la población bacteriana se duplicará siempre y cuando no se vea afectada por la incidencia de un virus.

- La tasa de adsorción es 1 (un fago por bacteria, sin formación de agregados). Esto quiere decir que cada bacteria es atacada por un único fago y que todos los fagos se adsorben
- El tiempo generacional de la bacteria es similar al de multiplicación del fago. El tiempo que transcurre entre la adsorción y la liberación de progenie es similar al tiempo en que le toma a una bacteria multiplicarse. También se asume que los dos fenómenos comienzan en el mismo instante.
- El *burst size* o cantidad de fagos producidos a partir de un único fago en una unidad de tiempo, es 100.

Con estos criterios, se plantearon ecuaciones que permitieran describir la interacción en intervalos de tiempo discretos.

X representa la concentración bacteriana, F el título viral y n el intervalo de tiempo. En caso de no existir interacción, el crecimiento bacteriano entre intervalos sigue la siguiente fórmula:

- $X_{n+1} = 2X_n$

Si no hay interacción, el título viral se mantiene constante:

- $F_{n+1} = F_n$

En cambio, si existe interacción, el crecimiento bacteriano y el título viral, pueden calcularse para cada intervalo utilizando las siguientes ecuaciones:

Crecimiento bacteriano:

- $X_{n+1} = 2(X_n - F_n)$ si $X_n > F_n$, siendo $X_n - F_n$ el número de células sobrevivientes en el intervalo n que pueden multiplicarse
- $X_{n+1} = 0$ si $X_n \leq F_n$ porque todas las bacterias serían lisadas

Multiplicación fágica:

- $F_{n+1} = F_n * 100$ si $X_n \geq F_n$, siendo 100 la cantidad de descendientes de un único fago.
- $F_{n+1} = (F_n - X_n) + X_n * 100$ si $X_n < F_n$, siendo $F_n - X_n$ la cantidad de fagos que quedan libres sin infectar, y $X_n * 100$ la cantidad de fagos que se generarán.

Se modelaron seis casos diferentes, siguiendo los criterios anteriormente expuestos. La concentración inicial de células se estableció en 1×10^6 ufc/ml para todos los casos y el control es un cultivo sin ser infectado.

Caso 1: cultivo monocepa, título viral inicial no detectable

Tabla 21: cálculos de concentración

n	Control	X	F
0	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+00
1	2,00E+06	2,00E+06	1,00E+02
2	4,00E+06	4,00E+06	1,00E+04
3	8,00E+06	7,98E+06	1,00E+06
4	1,60E+07	1,40E+07	1,00E+08

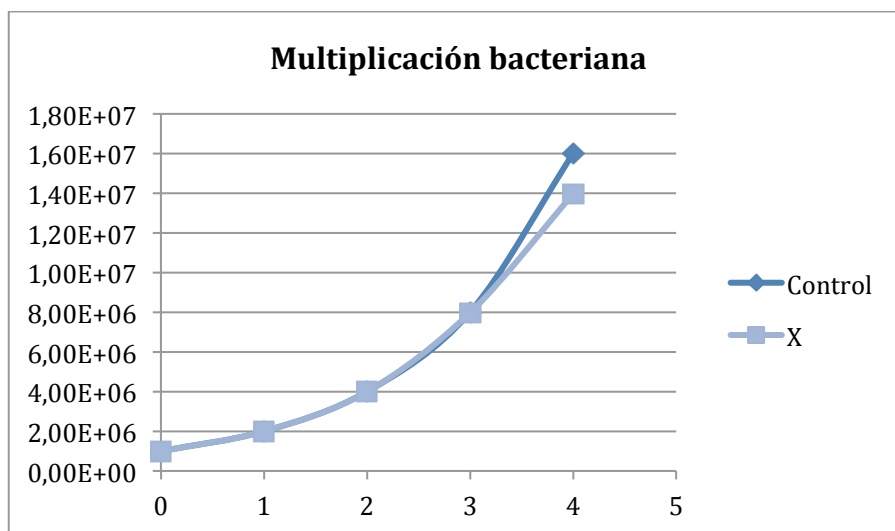


Figura 41: Gráfico de crecimiento bacteriano

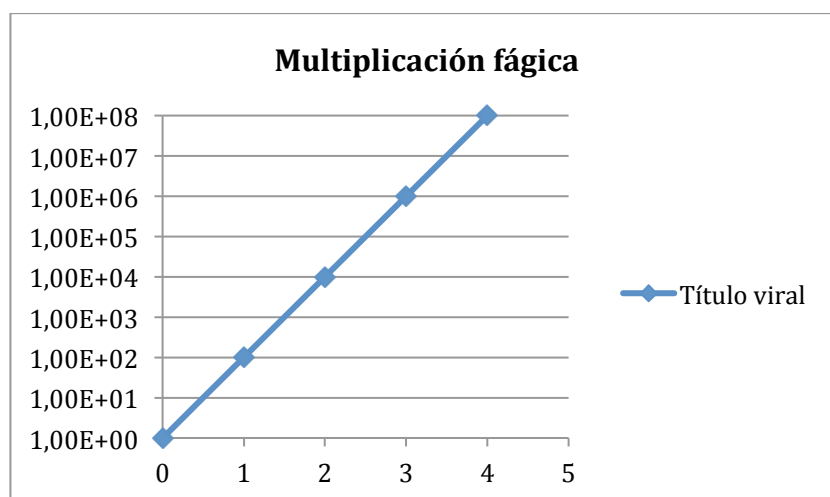


Figura 42: Gráfico de aumento del título viral

Este caso, permite observar que para este intervalo de tiempo y un título inicial sumamente bajo (1 fago por ml), un ataque viral podría no observarse a nivel de producción (Figura 41). Sin embargo, el alto título viral al final del proceso (Figura 42, Tabla 21) podría significar problemas a futuro, por factores como formación de aerosoles durante el proceso o reciclaje de materias prima como grasa del suero.

Caso 2: cultivo monocepa, título viral detectable bajo

Tabla 22: cálculos de concentración

n	Control	X	F
0	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+04
1	2,00E+06	1,98E+06	1,00E+06
2	4,00E+06	1,96E+06	1,00E+08
3	8,00E+06	0,00E+00	1,00E+08
4	1,60E+07	0,00E+00	1,00E+08

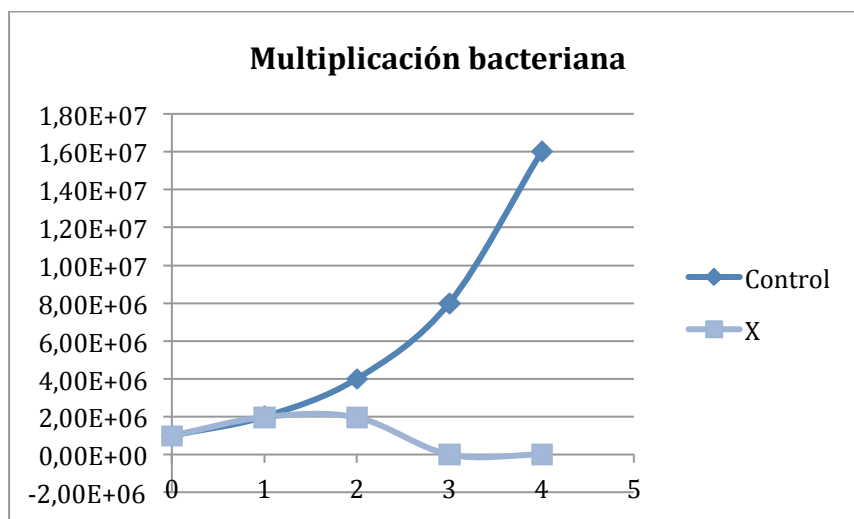


Figura 43: Gráfico de crecimiento bacteriano

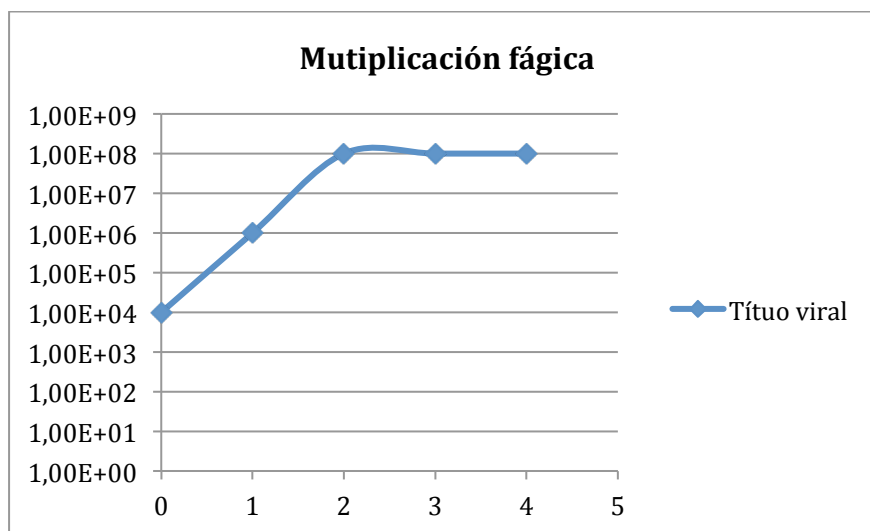


Figura 44: Gráfico de aumento del título viral

Este caso, permite inferir que cuando el título viral inicial es bajo pero detectable bajo las condiciones de qPCR optimizadas, un ataque en un cultivo monocepa debería poder observarse a nivel de producción (Figuras 43 y 44, Tabla 22).

Caso 3: cultivo monocepa, título viral alto

Tabla 23: cálculos de concentración

n	Control	X	F
0	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+08
1	2,00E+06	0,00E+00	1,99E+08
2	4,00E+06	0,00E+00	1,99E+08
3	8,00E+06	0,00E+00	1,99E+08
4	1,60E+07	0,00E+00	1,99E+08

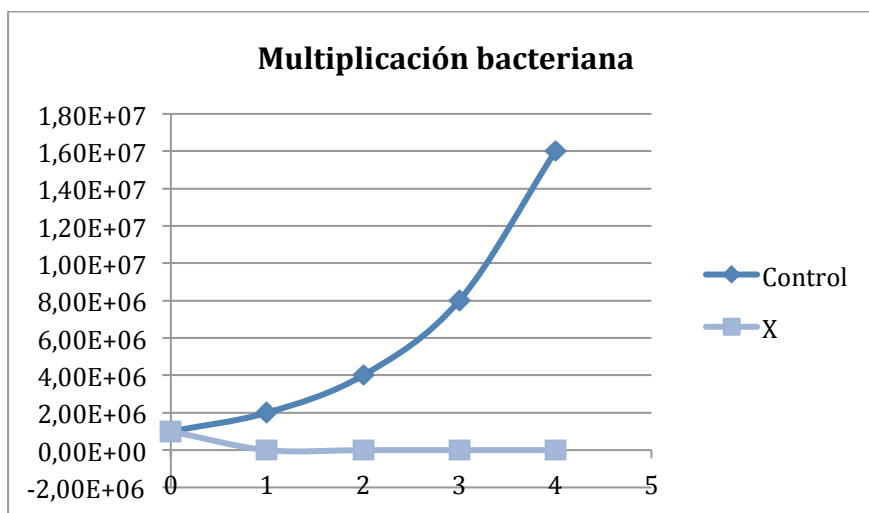


Figura 45: Gráfico de crecimiento bacteriano

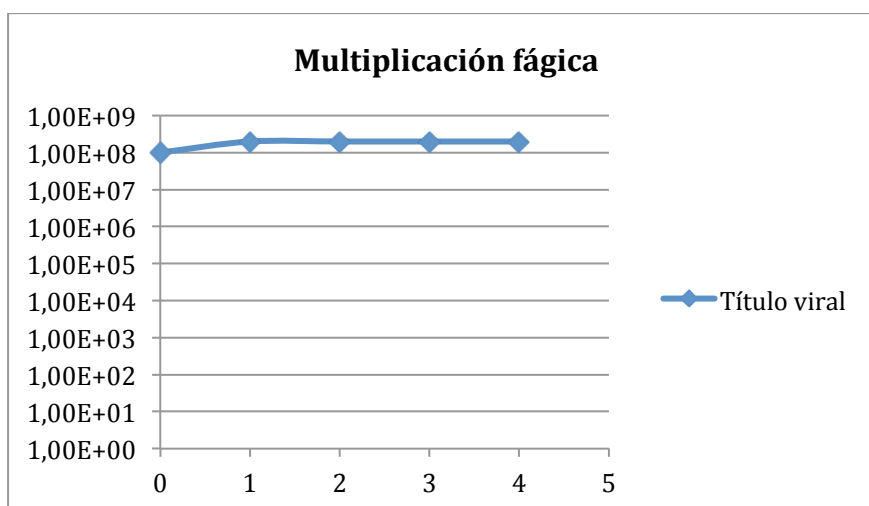


Figura 46: Gráfico de aumento del título viral

Este caso, permite inferir que cuando el título viral inicial alto, un ataque de en un cultivo monocepa debería poder observarse a nivel de producción (Figura 45). Sin embargo lo más interesante de este caso, es que no se observan variaciones importantes en el título viral (Figura 46, Tabla 23), lo que podría llegar a interpretarse como una ausencia de ataque, si no se tiene la información de lo ocurrido durante el proceso, es decir, si se envían las muestras pero no se informa si ocurrió o no un enlentecimiento en la fermentación.

Los casos cuatro (Figuras 47 y 48, Tabla 24), cinco (Figuras 49 y 50, Tabla 25) y seis (Figuras 51 y 52, Tabla 26) que se muestran a continuación, son homólogos a los casos uno dos y tres, con la diferencia de que en la simulación se parte de una situación más realista: un cultivo con dos cepas, de las cuales únicamente una es sensible al ataque. La concentración inicial de cada cepa es la mitad de la concentración total. La concentración celular en cada punto es la sumatoria de la de ambas cepas. Mientras que la concentración de la cepa sensible sufrirá variaciones ocasionadas por el ataque, la cepa no sensible (resistente) se multiplicará normalmente. Los resultados obtenidos son comparables a los obtenidos en las simulaciones anteriores, pudiendo observarse los ataques en los casos cinco y seis como retrasos en la producción.

Caso 4: cultivo multicepa, una sensible, título viral no detectable

Tabla 24: cálculos de concentración

n	Control	Real	X sensible	F
0	1,00E+06	1,00E+06	5,00E+05	1,00E+00
1	2,00E+06	2,00E+06	1,00E+06	1,00E+02
2	4,00E+06	4,00E+06	2,00E+06	1,00E+04
3	8,00E+06	7,98E+06	3,98E+06	1,00E+06
4	1,60E+07	1,40E+07	5,96E+06	1,00E+08

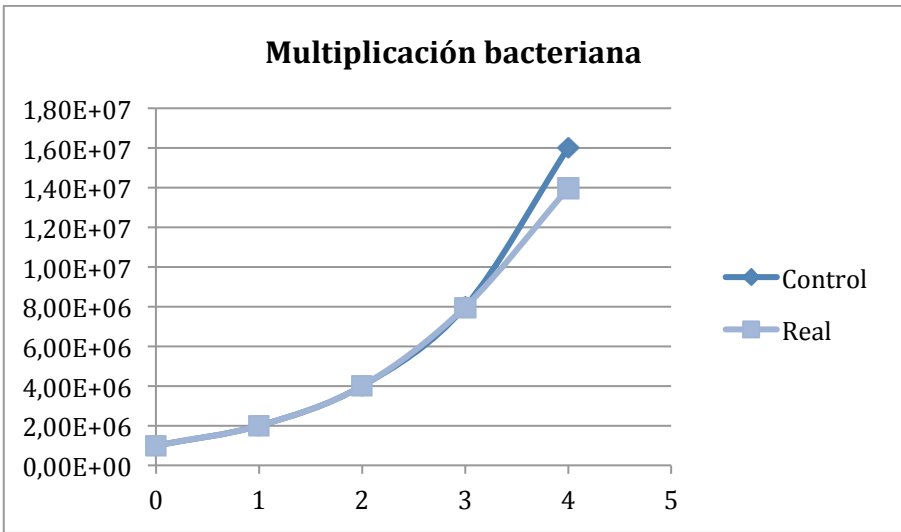


Figura 47: Gráfico de crecimiento bacteriano

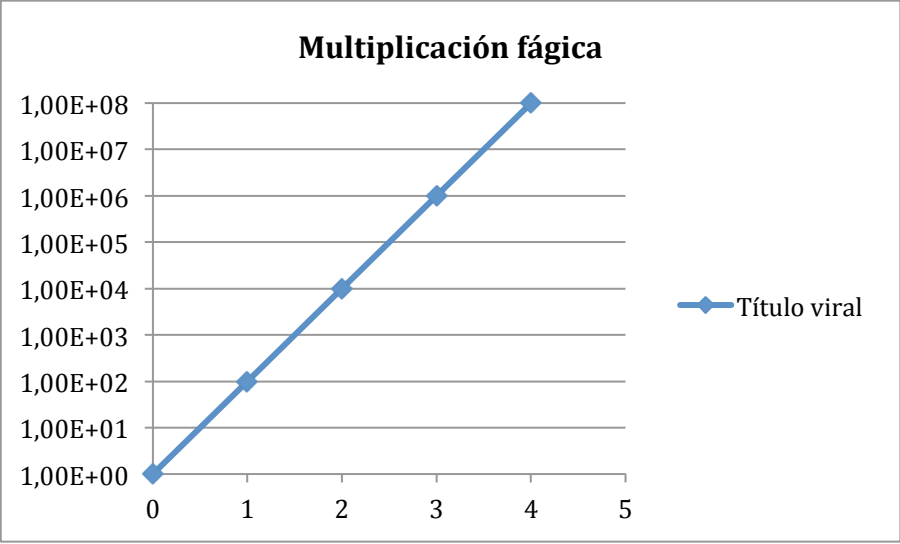


Figura 48: Gráfico de aumento del título viral

Caso 5: cultivo multicapa, una sensible, título viral detectable bajo

Tabla 25: cálculos de concentración

n	Control	Real	X	F
0	1,00E+06	1,00E+06	5,00E+05	1,00E+04
1	2,00E+06	1,98E+06	9,80E+05	1,00E+06
2	4,00E+06	2,00E+06	0,00E+00	1,00E+08
3	8,00E+06	4,00E+06	0,00E+00	1,00E+08
4	1,60E+07	8,00E+06	0,00E+00	1,00E+08

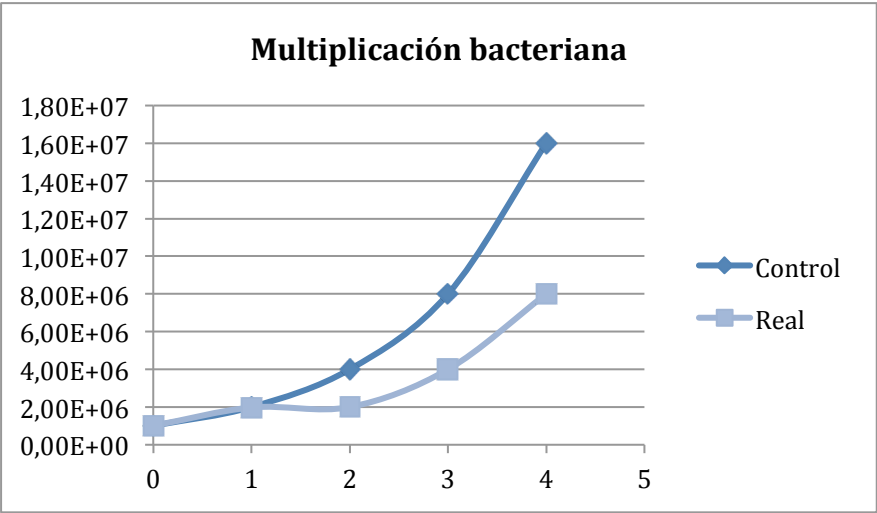


Figura 49: Gráfico de crecimiento bacteriano

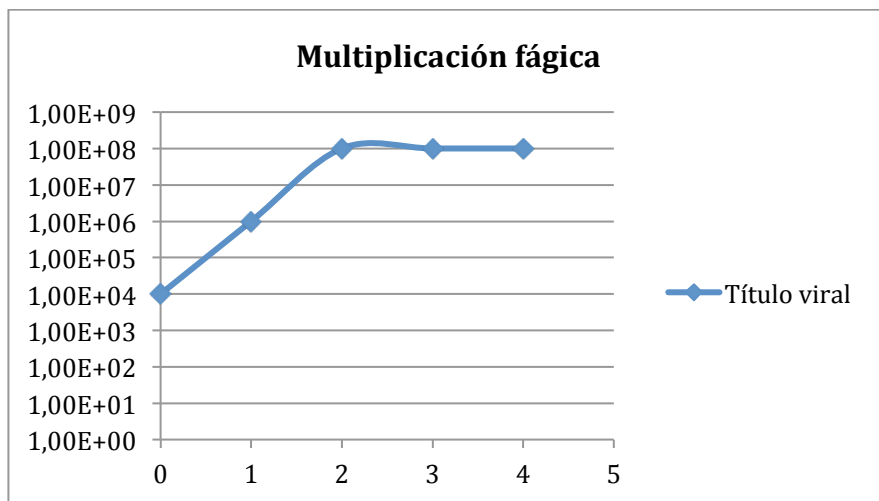


Figura 50: Gráfico de aumento del título viral

Caso 6: cultivo multicapa, una sensible, título viral alto

Tabla 26: cálculos de concentración

n	Control	Real	X sensible	F
0	1,00E+06	1,00E+06	5,00E+05	1,00E+08
1	2,00E+06	1,00E+06	0,00E+00	1,50E+08
2	4,00E+06	2,00E+06	0,00E+00	1,50E+08
3	8,00E+06	4,00E+06	0,00E+00	1,50E+08
4	1,60E+07	8,00E+06	0,00E+00	1,50E+08

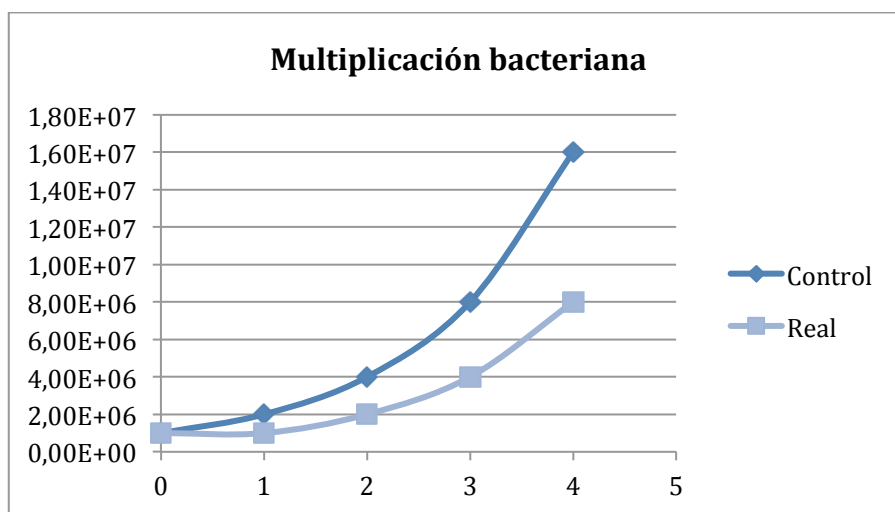


Figura 51: Gráfico de crecimiento bacteriano

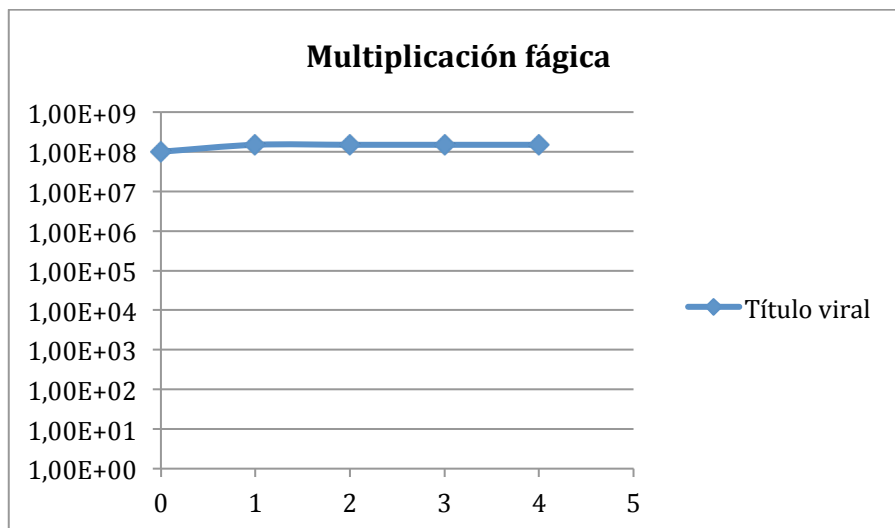


Figura 52: Gráfico de aumento del título viral

Conclusiones del modelo

De los resultados obtenidos de las simulaciones, se obtienen las siguientes conclusiones:

1. Un aumento en el título evidencia ataque
2. Si el título inicial es bajo o no detectable, un ataque siempre se evidencia como aumento en el título viral, aunque la falla en la producción no sea perceptible.
3. Títulos virales iniciales no detectables no necesariamente ocasionarán problemas de producción, a pesar de que el ataque ocurriera.
4. A mayor título inicial, la diferencia entre título final y título inicial es menor (comprobado experimentalmente)
5. El nivel de falla (tiempo en que se observa el enlentecimiento o frenado total de la fermentación), está asociado al título inicial de fagos.
6. Si no se conocen las condiciones de la fermentación (falla, retraso o normal) ni el título inicial, muestras de suero con título bajo, podrían descartarse, pero muestras con título alto deben analizarse para determinar si hubo ataque o no.
7. Si no se conocen las condiciones de la fermentación (falla, retraso o normal), las muestras de título alto que no presenten variación entre final e inicial deben analizarse para saber si hubo ataque.
8. Si el título inicial es detectable y bajo y al menos una de las cepas es sensible, existe una gran probabilidad de observar fallas.

Los resultados del modelo son simplemente guías para la selección de muestras para aislar fagos, cuando la cantidad es muy grande y no pueden procesarse en su totalidad. La realidad de la dinámica de las interacciones depende de muchos factores no contemplados o simplificados en este caso. El grado de sensibilidad, así

como el tiempo de multiplicación fágica y el *burst size*, depende de cada fago y cada cepa y de la relación entre los mismos. La eficiencia y tiempo de multiplicación bacteriana también depende de factores operativos propios de cada planta (concentración inicial de inóculo, calidad de la leche, temperatura de trabajo, agitación, etc).

De las observaciones experimentales realizadas (análisis de muestras de leche), surge que no es frecuente encontrar títulos iniciales muy altos. Esto lleva a pensar que en un escenario en que se tenga únicamente una muestra de suero con título alto, es más que probable que haya ocurrido un ataque por fagos.

Se ha observado, que cuando se utilizan fermentos definidos, constituidos por una o por unas pocas cepas, en algunos casos, pueden llegar a ser inhibidos por títulos fágicos bajos ($1-10^3$ ufp/ml), mientras que en el caso de fermentos indefinidos, no son inhibidos hasta títulos en torno a 10^8 ufp/ml o incluso superiores. Estas consideraciones han llevado a establecer un título fágico umbral consenso, por encima del cual se considera que puede tener lugar la inhibición o incluso llegar a detener el proceso de fermentación, este título se establece en 10^5 ufp/ml (Neve et al., 1991)

Para comprobar algunas de estas conclusiones, se realizaron ensayos que corroboraron que el título inicial de fagos en la leche condiciona el nivel de falla en la fermentación y que cuanto mayor es el título inicial, menor es la variación en el título de fagos observada al final del proceso.

Ensayo de fermentación con distintas concentraciones iniciales de fago

Este ensayo fue realizado en las siguientes condiciones: las fermentaciones fueron llevadas a cabo según se explica en materiales y métodos, utilizando el mismo lote de leche en polvo para evitar variaciones. Las concentraciones de fago iniciales elegidas para este ensayo fueron de 10^5 ufc/ml y 10^8 ufc/ml respectivamente. El tercer matraz es el control (cultivo no infectado). Las curvas resultantes se muestran en la Figura 53.

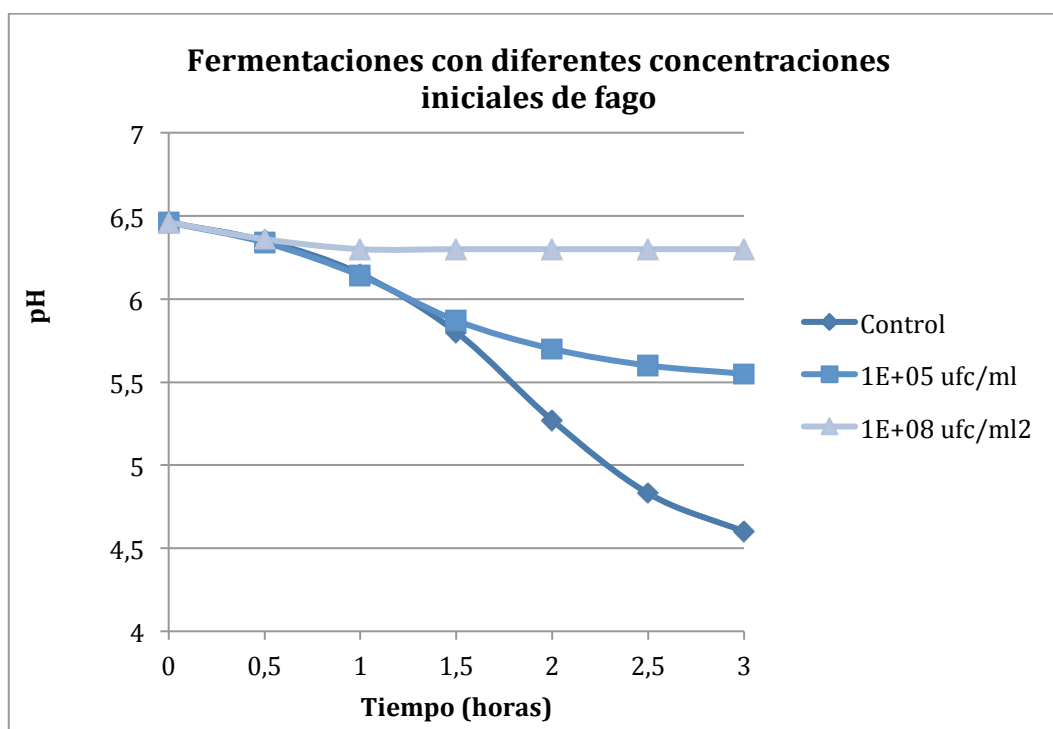


Figura 53: Perfiles de acidificación con diferentes concentraciones iniciales de fagos

En este ensayo, se observa que en la muestra inoculada con 10^8 ufc/ml prácticamente no se observa variación en el pH, lo que indicaría que las células murieron en las primeras etapas del ensayo. En la muestra inoculada con 10^5 ufc/ml, se observa que la fermentación transcurre normalmente en las primeras etapas del ensayo, pero se enlentece casi completamente al final. Este perfil de acidificación es una muestra de cómo el ataque viral afecta la multiplicación bacteriana a lo largo de una fermentación. De la comparación de ambos perfiles, podemos concluir que efectivamente el título viral inicial presente en la leche es importante en el nivel de falla que se pueda observar a lo largo del proceso.

Ensayo de infección para determinar variaciones en el título viral (ΔF) dependiendo de la concentración inicial de fagos.

Este experimento se realizó según se detalla en materiales y métodos. La concentración de fagos elegida para este experimento a tiempo 0 en el tubo fue de 5×10^5 ufc/ml. En total se realizaron tres reinoculaciones. Al final de la última lisis, también se tomó muestra para analizar por qPCR (Tabla 27). Los resultados del análisis con los correspondientes cálculos de ajuste, se muestran en la gráfica de la Figura 54. La primera lisis total tomó dos horas, mientras que en los otros casos, la lisis total se observó a la hora o antes. Para evitar sesgos, en aquellos casos que la lisis se observó antes, se esperó a que se completara la hora antes de proseguir.

Tabla 27: evolución del título viral

Intervalo	Título viral
0	5,00E+05
1	2,11E+07
2	4,37E+07
3	6,90E+07
4	8,33E+07

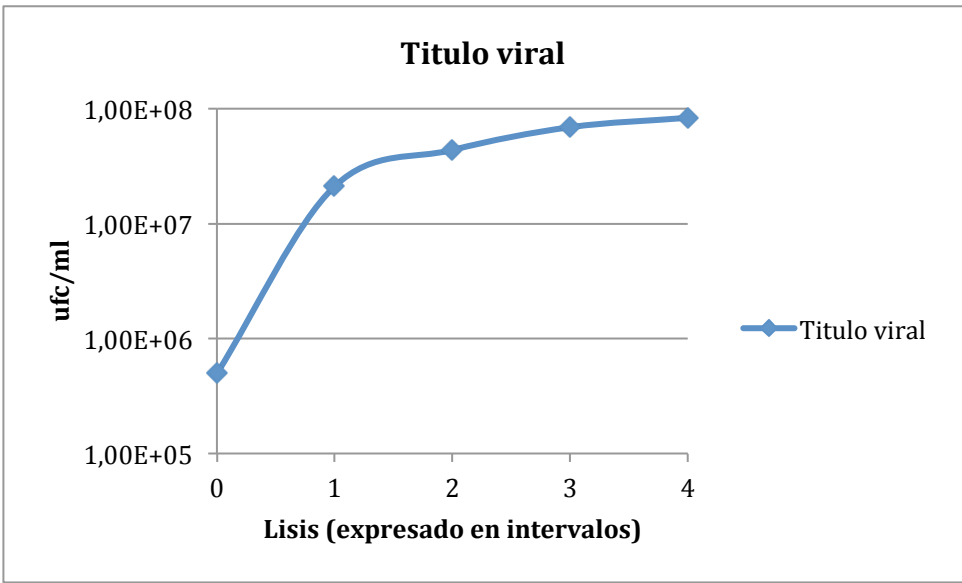


Figura 54: Gráfico de aumento del título viral

Los resultados del ensayo ocurrieron según lo esperado. Se observa un incremento muy grande después de la primera lisis (4120%), y los valores de aumento en las lisis subsiguientes van decayendo. Después de la segunda lisis, observamos un

aumento del 107% en el título, luego de la tercera un aumento del 58% y en la última el incremento es únicamente del 21%. Estos resultados se condicen con la conclusión número tres obtenida de las simulaciones con el modelo, lo que reafirma la aseveración de que en caso de no conocerse las condiciones de la fermentación a nivel de planta, si se observan títulos altos en la muestra de suero y leche con poca variación, se debe igualmente intentar aislar bacteriófagos de la misma.

Construcción y caracterización de un banco de bacteriófagos de *Streptococcus thermophilus*

El número de muestras de suero y potes de fermentos que dieron resultados positivos para los ensayos de qPCR fue de 187 de las cuales, 58 fueron seleccionadas para ensayos de aislamiento, siguiendo los criterios anteriormente expuestos (ver Anexo 2). A partir de estas 58 muestras, se obtuvieron 115 aislamientos de fagos potencialmente diferentes (ver el Anexo 3). El número superior de aislamientos a muestras explica por lo siguiente: la bibliografía coincide en que es muy raro encontrar más de un bacteriófago en una misma muestra de suero, pero en algunos casos, fuimos capaces de detectar fagos de tipo *cos* y tipo *pac* en una única muestra de suero, lo que significa que al menos dos fagos diferentes estaban presentes en la misma muestra. Es por esto, que, en cada ensayo de aislamiento, se tomaron varias playas de lisis aisladas para continuar los estudios, y por ende fueron consideradas como fagos diferentes hasta comprobarse lo contrario.

Ensayos de sensibilidad / resistencia

Los ensayos de sensibilidad / resistencia fueron llevados a cabo según se detalla en materiales y métodos. Los resultados de estos ensayos se resumen en la Tabla 28, donde se muestra los 15 perfiles de ataque diferentes observados.

Perfiles de restricción

Se caracterizaron los fagos aislados por realización de perfiles de restricción de los genomas virales. El procedimiento llevado a cabo se detalla en materiales y métodos. Se realizó la extracción del genoma de los fagos y luego la digestión con dos enzimas de restricción (*EcoRI* y *EcoRV*) para cada fago. Se obtuvieron 15 perfiles de restricción diferentes, los cuales se muestran en las Figuras 55, 56 y 57.

Gracias a estos ensayos, pudimos reducir la cantidad de fagos en nuestra colección a 15 virus diferentes.

Tabla 28: Matriz de sensibilidad/resistencia de los 15 fagos diferentes aislados en Uruguay

Cepas	Bacteriófagos														
	φ53	φ73	φB4	φSt	φ93	φ94	φ106	φ107	φ115	φ116	φ123	φ128	φ131	φ140	φ142
UY01	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
UY02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
UY03	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY04	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
UY05	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
UY06	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UY07	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY09	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
UY10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
UY16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
UY20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY22	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
UY23	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
UY24	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY25	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
UY26	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UY27	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UY28	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UY29	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
UY30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
UY38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY40	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
UY41	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY42	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
UY43	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY44	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY45	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
UY46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UY47	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
UY48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
UY49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
UY50	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

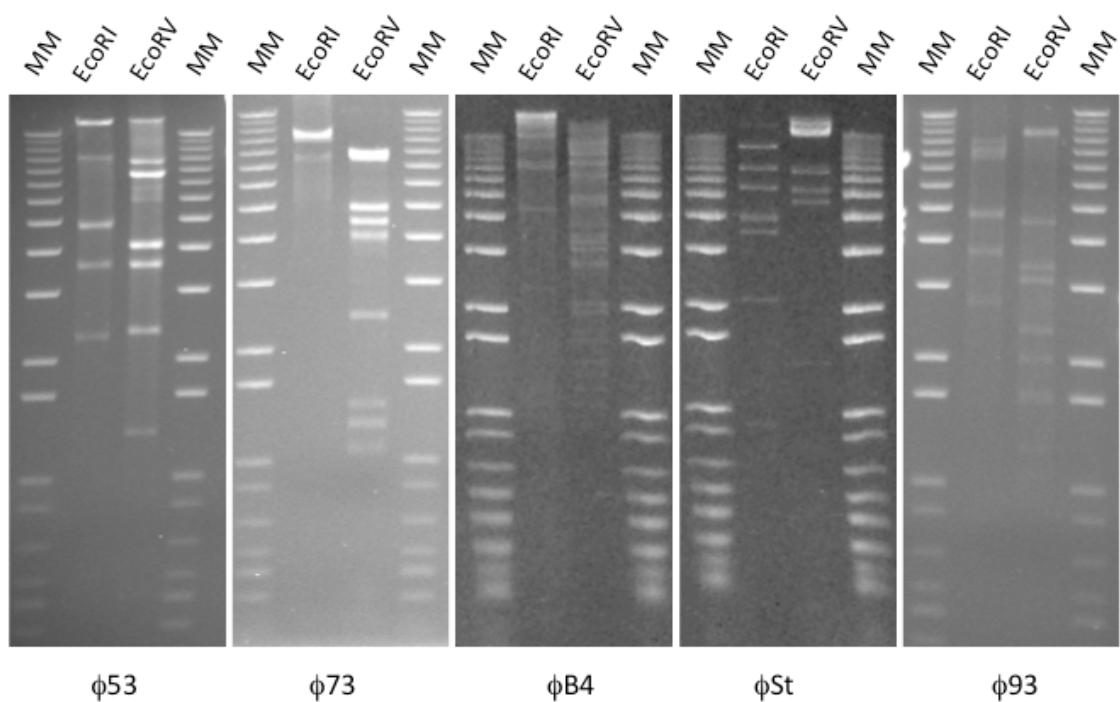


Figura 55: perfiles de restricción de genomas virales utilizando EcoRI y EcoRV. MM: 1kb+ Invitrogen

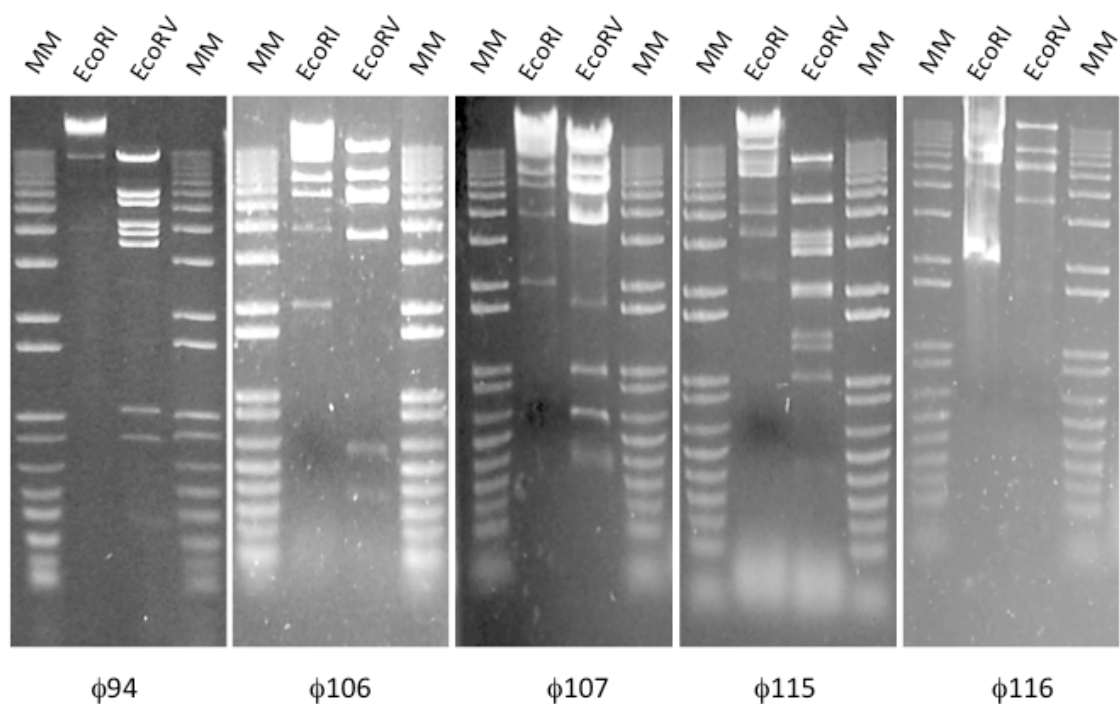


Figura 56: perfiles de restricción de genomas virales utilizando EcoRI y EcoRV. MM: 1kb+ Invitrogen

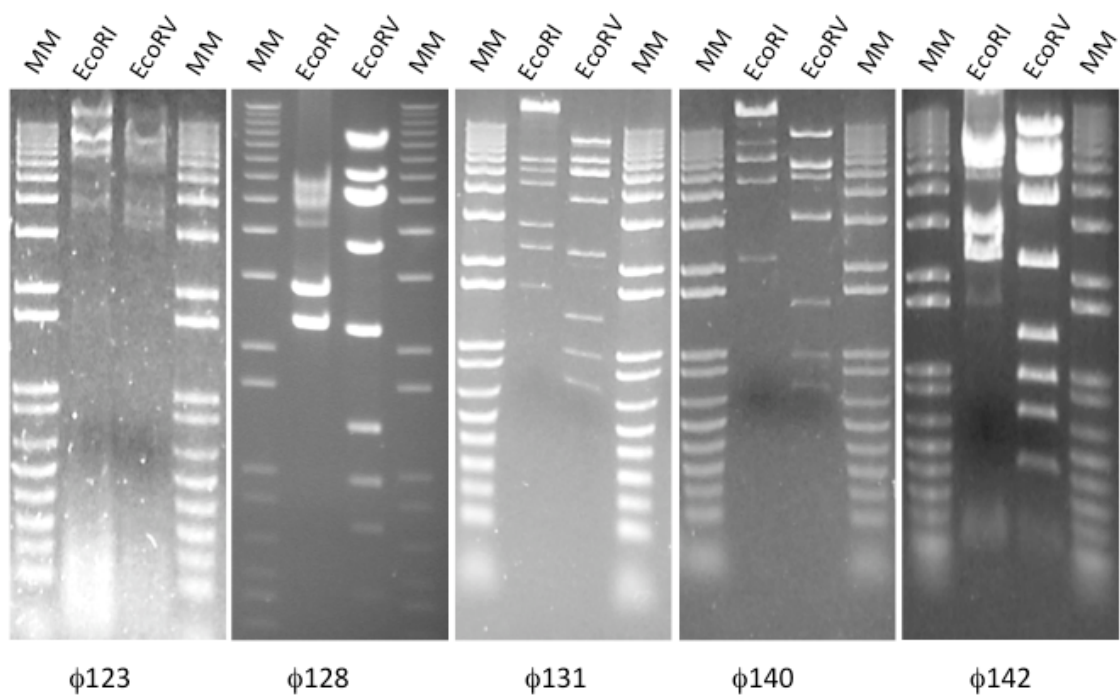


Figura 57: perfiles de restricción de genomas virales utilizando EcoRI y EcoRV. MM: 1kb+ Invitrogen

Análisis de genomas virales

Completamos la caracterización de algunos de los bacteriófagos de la colección realizando su análisis genómico. Este estudio se realizó gracias a la colaboración con el Dr. Sylvain Moineau en la Université Laval, Canadá. Los fagos cuyos genomas fueron secuenciados fueron $\phi 53$, $\phi 72$, $\phi 73$, $\phi 93$, $\phi 107$ y $\phi 128$. Los criterios utilizados para seleccionar los fagos a estudiar fueron variados. $\phi 53$, el primer fago aislado en este trabajo, fue elegido por el alto número de cepas de la colección que es capaz de infectar; $\phi 73$ y $\phi 72$ fueron seleccionados por tratarse de fagos que posee la particularidad de no ser detectables utilizando los cebadores Host; $\phi 93$ fue escogido por tratarse del único fago *pac* de la colección; $\phi 107$ fue seleccionado al igual que $\phi 53$ por el amplio número de cepas capaz de infectar y por último $\phi 128$ fue seleccionado porque es el fago que fue aislado del mayor número de muestras de diferentes lugares y fechas de muestreo.

El análisis de genomas virales cumple dos objetivos principales en nuestro trabajo. En primer lugar, conocer en profundidad su estructura genética y compararlos con otros fagos aislados en la región y el mundo. De esta forma se podrá determinar si existen relaciones entre ellos y si poseen particularidades los virus aislados en Uruguay. En segundo lugar, el análisis genómico es una importante herramienta para el estudio y selección de bacterias mutantes CRISPR resistentes..

Para realizar el análisis de los genomas virales se extrajo el ADN genómico de cada uno de los fagos de interés a partir de un lisado de alto título del fago puro, los ADN puros obtenidos fueron enviados a secuenciar y una vez recibidos los resultados de las secuencias, los *contigs* (fragmentos de ADN relativamente cortas que comparten parte de su secuencia entre si) obtenidos fueron ensamblados (ver materiales y métodos).

El primer paso del análisis de la secuencia genómica propiamente dicha, fue ubicar los extremos del genoma. Para el caso de los fagos tipo *cos*, por convención se establece que el extremo 5' del genoma es el sitio de circularización o sitio *cos*. El sitio *cos* puede ubicarse en el genoma gracias a su secuencia consenso conservada 5'-CCACGACAAGGTG-3'. Una vez ubicada la misma, se establece como extremo del genoma y se eliminan las repeticiones en el extremo 3' que puedan haberse agregado como resultado del ensamblaje de los *contigs* post secuenciación. Para el caso de los fagos *pac*, los extremos del genoma se establecen mediante comparación con otros genomas virales presente en la base de datos, a fin de que el ordenamiento de los ORFs (*open reading frames* o marcos abiertos de lectura) tenga cierta coherencia y permita llevar a cabo con mayor facilidad los análisis comparativos.

Una vez que se establecieron los extremos de los genomas, el paso siguiente fue anotar los genes presentes en cada genoma. La búsqueda primaria de ORFs fue

llevada a cabo utilizando la herramienta ORF Finder del NCBI. Los ORFs muy pequeños (menos de 25 aminoácidos) fueron descartados. El paso siguiente fue establecer correctamente los codones de inicio de cada ORF. Por defecto el programa ORF Finder busca solamente ORFs cuyo codón de inicio sea ATG no tomando en cuenta los codones alternativos de inicio TTG y GTG, por lo que es necesario explorar la secuencia aguas arriba del codón de inicio establecido por el programa, para buscar posibles codones de inicio alternativos que pudieran haber sido obviados.

Luego de realizada esta anotación, se buscó cuales de aquellos posibles genes realmente poseían el potencial de ser expresados. Para esto, se buscaron los sitios RBS (*ribosomal bindings sites* o sitios de unión al ribosoma). Ya que la expresión de los genes virales ocurre dentro del hospedero, el RBS de estos genes debe ser similar al de los genes bacterianos. La secuencia RBS consenso de *Streptococcus thermophilus* es 5'-AAAGGAGGTGA-3'. El criterio que se estableció para aceptar un posible RBS fue que la secuencia RBS se encontrara a no más de 10 bases aguas arriba del codón de inicio de la transcripción, y que esta debía poseer un mínimo de cinco bases similares a la secuencia consenso.

Finalizado este paso, se analizaron manualmente las regiones intergénicas en busca de posibles ORFs que no hubieran sido detectados por el ORF Finder. Los genomas fágicos poseen por lo general poco ADN no codificante, es por eso que si se observan grandes regiones intergénicas (mayores a 100 pares de bases) deben buscarse posibles genes.

Tablas de anotación

El paso final en la anotación es la confección de las tablas de anotación y las representaciones gráficas de los genomas. En estas tablas se anotan las características de cada gen, además de compararse las proteínas virales con la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), y con el grupo de fagos uruguayos anotados. Estas tablas condensan la información obtenida en el proceso de anotación y son la herramienta principal de análisis, en conjunto con las representaciones gráficas de los genomas.

Tabla 29: Anotación del genoma del fago ϕ 53. Las proteínas hipotéticas se marcan con un -.

Fago ϕ 53											
ORF	Inicio	Fin	%GC	Tam (aa)	MW (kDa)	pI	RBS <u>AAAGGAGGTGA</u>	Función o similitud	BLAST match con fagos de <i>Streptococcus thermophilus</i>	% ildentidad (aa)	No. de acceso GenBank
1	296	757	40	153	17.42	6.8	<u>AACGGAGAGGA</u> ^{GTAATGATGA} GTG	Subunidad menor, Terminasa	ORF2, DT1	144/151(95%)	NP_049390.1
2	1030	1938	35	302	35.9	9	<u>AAAGGGCAAAA</u> ATG	-	Hypprotein, <i>B. cereus</i>	125/305(41%)	WP_002192091.1
3	1919	3793	40	624	71.9	4.6	<u>AAAGGAGGTGCTTG</u>	Subunidad mayor, Terminasa	ORF22, 7201	526/623(84%)	NP_038323.1
4	3797	3976	37	59	6.6	9.8	<u>AGAGGAGTATT</u> ^{AATAT} ATG	Proteína de unión cola-cápside	ORF5, DT1	59/59(100%)	NP_049393.1
5	3994	5154	41	386	42.7	5	<u>AAAGGAGGTGA</u> ^{TAACAA} TTG	Proteína Portal	ORF6, DT1	383/386(99%)	NP_049394.1
6	5141	5809	38	222	24.5	4.7	<u>AAAGGAGGTGA</u> ^{GATAAA} ATG	Proteína de andamiaje	ORF5, Abc2	222/222(100%)	YP_003347414.1
7	5824	7017	38	397	44.1	4.9	<u>AAAGGAAAA</u> ^{ATTAA} ATG	Subunida mayor, cápside	ORF6, Abc2	393/397(99%)	YP_003347415.1
8	7032	7346	44	104	11.6	4	<u>TTAGGAGGTAA</u> ^{GCT} ATG	Proteína de empaquetamiento de ADN	ORF9, DT1	104/104(100%)	NP_049397.1
9	7346	7696	40	116	13.3	9.9	<u>GAAAGAGGTGA</u> ^{CTA} ATG	Proteína de unión cola-cápside	ORF10, DT1	116/116(100%)	NP_049398.1
10	7703	8125	43	140	15.6	10	<u>AAGTTGGGTGA</u> ^{TAGCTT} ATG	Proteína de cola	ORF11, DT1	137/140(98%)	NP_049399.1
11	8130	8501	32	123	14.1	4.2	<u>AAGGGAGGGGA</u> ^{GTAATTAA} GTG	Proteína de cola	ORF12, DT1	119/123(97%)	NP_049400.1
12	8520	9128	40	202	21.9	6.5	<u>AAAGGAGAAAA</u> ^{TATAT} ATG	Subunidad mayor, cola	ORF11, Abc2	197/203(97%)	YP_003347420.1
13	9202	9555	37	117	13.5	4.3	<u>AAAGGAGTAAA</u> ^{GACCACA} ATG	Proteína de cola	ORF14, DT1	114/117(97%)	NP_049402.1
14	9774	14744	42	1656	182.8	10	<u>AAAGGAGGGAA</u> ^{TATAAC} ATG	Proteína de cola	ORF15, DT1	1600/1656(97%)	NP_049403.2
15	14741	16300	40	519	58.5	5.9	<u>TTAGGAGGTCA</u> ^{AATTAT} TTG	Proteína de cola	ORF15, Abc2	517/519(99%)	YP_003347424.1
16	16300	18885	39	861	97.8	4.8	<u>GAAGGAGCGCT</u> ^{TTGTTTAA} ATG	Antirreceptor viral	ORF18, Abc2	780/861(91%)	AAK83243.1
17	18886	20934	42	682	75	6.2	<u>GTAGGAGGTTT</u> ^{TTAA} TTG	Proteína de cola	ORF21, 2972	538/660(82%)	YP_238504
18	20960	21370	34	136	15.7	4.5	<u>AAAGGAATAAT</u> ^r ATG	-	ORF20, ALQ13.2	135/136(99%)	YP_003344866.1
19	21390	21536	30	48	5.6	9.8	<u>AAAGGATAAAA</u> ^{AGAT} ATG	-	ORF22, DT1	48/48(100%)	NP_049410.1
20	21554	21877	36	107	12.3	6.5	<u>ATAGGAGGGAT</u> ^{GTGTT} ATG	-	ORF22, ALQ13.2	93/103(90%)	YP_003344868.1
21	21874	22116	37	80	8.9	9.8	<u>AGAGGATAATA</u> ^{ATAAAA} ATG	-	ORF24, DT1	78/80(98%)	NP_049412.1
22	22118	22963	41	281	31.3	4.2	<u>AAAGGAGAAAT</u> ^{AAAA} ATG	Lisina	ORF22, Abc2	257/281(91%)	YP_003347431.1
23	23057	23179	35	40	4.7	7.4	<u>GAAGCCTCAGC</u> ^{ATT} ATG	-	-	-	-
24	23348	23445	32	31	3.7	11.7	<u>ATAAGTGGTAAT</u> ^{TATAAT} TTG	-	-	-	-
25	23650	23877	38	75	8.6	9.9	<u>AAAGGAGATAA</u> ^{CCT} ATG	Represor tipo Cro	ORF44, 5093	71/75(95%)	YP_002925127.1
26	23895	24185	36	96	11.2	7.3	<u>AAAGGAACAAT</u> ATG	-	Hypprotein, <i>S. agalactiae</i>	64/90(71%)	WP_001156317.1
27	24328	24531	35	67	7.6	9.7	<u>AGAGGAGGAAC</u> ^{AAAA} ATG	Regulador tipo Cro	ORF5, TP-J34	59/67(88%)	YP_007392252.1
28	24783	24917	36	44	5.2	10.8	<u>AAAGGAATT</u> ^{TTAAAA} ATG	-	ORF32, ALQ13.2	43/46(93%)	YP_003344878.1

29	25119	25445	34	108	12.8	4.6	AAAGTATCAAC_TATG	-	ORF31, DT1	104/104(100%)	NP_049419.1
30	25449	26150	43	233	26.4	4.7	AAAGGAAGAAA_{TAACGG}ATG	-	ORF32, DT1	233/233(100%)	NP_049420.1
31	26125	27456	40	443	50.4	9	AAATTTGGTGA_{TTTAG}ATG	Helicasa	ORF33, DT1	439/443(99%)	NP_049421.1
32	27463	27918	36	151	17.3	4.9	TATGGAGATAA_{AAAACT}ATG	-	ORF34, DT1	150/151(99%)	NP_049422.1
33	27921	28736	40	271	30.5	7.9	ACCTTCCG_{TTC}_{TAATT}ATG	Proteína de replicación	ORF35, DT1	271/271(100%)	NP_049423.1
34	28717	30240	36	507	59.2	7.6	AAATAAGGAGG_ATTG	Primasa	ORF38, 2972	492/505(97%)	YP_238521.1
35	30777	31100	38	107	12.2	10.3	AAAGGAGATGTATG	-	ORF38, DT1	105/107(98%)	NP_049426.1
36	31081	31329	37	82	9.7	9	CTATGAGGATA_{GTTG}ATG	-	ORF39, DT1	82/82(100%)	NP_049427.1
37	31314	31790	39	158	18.5	4.7	GAAAGAGATGG_{TAGAACT}ATG	Proteína de unión al ADN	ORF42, 2972	103/109(94%)	YP_238525.1
38	31759	32067	41	102	11.2	9.8	AAAGGAAAGAT_{GGTAA}ATG	-	ORF24, TP-J34	76/104(73%)	YP_007392271.1
39	32064	32771	37	235	27.7	9.7	AAAGGAAGAGG_{GCA}ATG	-	ORF45, Abc2	235/235(100%)	YP_003347454.1
40	33105	33524	38	139	16.5	9.8	AAATTATTATA_{CC}ATG	-	ORF45, DT1	132/132(100%)	NP_049433.1
41	33597	34145	46	182	21.2	10.2	TCAGAAGGACA_{CAGTA}GTG	HNH endonucleasa	ORF46, DT1	180/185(97%)	NP_049434.1

Tabla 30: Anotación del genoma del fago ϕ 73. Las proteínas hipotéticas se marcan con un -.

Fago ϕ 73											
ORF	Inicio	Fin	%GC	Tam (aa)	MW (kDa)	pl	RBS <u>AAAGGAGGTGA</u>	Función o similitud	BLAST match con fagos de <i>Streptococcus thermophilus</i>	% ildentidad (aa)	No. de acceso GenBank
1	87	459	39	152	17	5.1	<u>AACGGAGAGGA</u> ^{GTAATGATGA} GTG	Subunidad menor, Terminasa	ORF152, Sfi21	145/152(95%)	NP_049966.1
2	567	2438	41	623	71.5	4.7	<u>AAAGGAGCAAC</u> ^A GTG	Subunidad mayor, Terminasa	ORF2, Abc2	611/623(98%)	YP_003347411.1
3	2442	2621	37	59	6.6	8.1	<u>ATTAGAGGAGT</u> ^{ATTAATAT} ATG	Proteína de unión cola-cápside	ORF3, Abc2	59/59(100%)	YP_003347412.1
4	2639	3799	41	368	42.7	5.1	<u>AAAGGAGGTGA</u> ^{TAACAA} ATG	Proteína Portal	ORF4, Abc2	384/386(99%)	YP_003347413.1
5	3786	4454	38	222	24.5	4.9	<u>AAAGGAGGTGA</u> ^{GATAA} ATG	Proteína de andamiaje	ORF7, DT1	222/222(100%)	NP_049395.1
6	4469	5662	38	397	44.2	5.1	<u>AAAGGAAAATA</u> ^{ATTAA} ATG	Subunidad mayor, cápside	ORF6, Abc2	393/397(99%)	YP_003347415.1
7	5677	5991	44	104	11.6	4.2	<u>TTAGGAGGTAA</u> ^{GCT} ATG	Proteína de empaquetamiento de ADN	ORF9, DT1	104/104(100%)	NP_049397.1
8	5991	6341	40	116	13.5	9.6	<u>GAAAGAGGTGA</u> ^{CTA} ATG	Proteína de unión cola-cápside	ORF8, Abc2	115/116(99%)	YP_003347417.1
9	6348	6770	43	140	15.6	9.4	<u>AAGTTGGGTGA</u> ^{TAGCTT} ATG	Proteína de cola	ORF11, DT1	137/140(98%)	NP_049399.1
10	6775	7146	32	123	14	4.4	<u>AAGGGAGGGGA</u> ^{GTGATTAA} GTG	Proteína de cola	ORF12, DT1	119/123(97%)	NP_049400.1
11	7165	7773	40	202	21.8	6.1	<u>AAAGGAGAAAA</u> ^{TATATA} ATG	Subunidad menor, cola	ORF11, Abc2	197/203(97%)	YP_003347420.1
12	7847	8200	37	117	13.5	4.5	<u>AAAGGAGTAAA</u> ^{GACCACA} ATG	Proteína de cola	ORF14, DT1	114/117(97%)	NP_049402.1
13	8419	13389	41	1656	183.2	9.3	<u>AAAGGAGGGAA</u> ^{TATAAC} ATG	Proteína de cola	ORF15, DT1	1591/1656(96%)	NP_049403.2
14	13386	14945	40	519	58.4	5.6	<u>TTAGGAGGTCA</u> ^{AATTAT} TTG	Proteína de cola	ORF15, Abc2	514/519(99%)	YP_003347424.1
15	14924	19234	41	1436	159.6	5.1	<u>CCAACAATTGA</u> ^{AAATTC} ATG	Antirreceptor viral	ORF18, MD2	85%	AAK83242.1
16	19235	21241	42	668	73	6.3	<u>GTAGGAGGTTT</u> ^{TTAA} TTG	Subunidad menor, cola	2972	592/673(88%)	YP_238504.1
17	21257	21604	33	115	13.3	4.7	<u>AAAGAAGGAAA</u> ^{ATTCA} ATG	-	ORF50, TP-J34	110/115(96%)	YP_007392297.1
18	21624	21770	34	48	5.4	9.5	<u>GAAAGAGGAAA</u> ^{AAGAT} ATG	-	ORF51, TP-J34	46/48(96%)	YP_007392298.1
19	21788	22111	35	107	12.5	5.8	<u>ATAGGAGGGAT</u> ^{GTGTT} ATG	-	ORF22, ALQ13.2	106/107(99%)	YP_003344868.1
20	22119	22361	36	80	8.9	8.1	<u>TGAGAGGATGA</u> ^{AGAATAA} ATG	Holina	ORF23, ALQ13.2	79/80(99%)	YP_003344869.1
21	22363	23208	42	281	31.2	4.3	<u>AAAGGAGAAAT</u> ^{AAA} ATG	Lisina	ORF22, Abc2	263/281(94%)	YP_003347431.1
22	23526	24077	38	183	21.4	7.7	<u>GGGAGAGGTAA</u> ^{ACAAA} ATG	-	ORF27, ALQ13.2	171/183(93%)	YP_003344873.1
23	24284	25156	32	290	33.5	5.2	<u>AGAGAGGGATT</u> ^{TA} ATG	Mtiltransferasa adenina específica	*	285/290(98%)	CAB46541.1
24	25333	25536	38	67	7.7	9.7	<u>GAAGGAGGAAC</u> ^{AAA} ATG	Reguador tipo Crp	ORF23, Abc2	60/67(90%)	YP_003347432.1
25	25526	26521	37	331	38.7	5.5	<u>AAATCGTCTGA</u> ^{TTTGT} ATG	-	ORF45, 5093	194/284(68%)	YP_002925128.1
26	26514	27053	35	179	20.7	8.8	<u>GAAGGAGAAAT</u> ^{CATCA} ATG	-	ORF46, 5093	162/166(98%)	YP_002925129.1
27	27180	27389	28	69	8.2	8.8	<u>AAAGGAGAAAC</u> ^{GAA} ATG	Represor tipo Cro	ORF31, ALQ13.2	68/69(99%)	YP_003344877.1
28	27422	27565	31	47	5.5	9.8	<u>TAGAGAGGAAT</u> ^{CAAAA} ATG	-	ORF29, Abc2	43/47(91%)	YP_003347438.1

29	27877	28686	33	269	31.5	7.7	<u>AAAGAGAGGGA</u>_{TAAGATTA}ATG	-	ORF4, 7201	235/269(87%)	NP_038304.1
30	28699	29481	39	260	30.5	8.2	<u>CTAAGAGGTTCTTTAT</u>ATG	Proteína tipo DnaC	ORF5, 7201	233/260(90%)	NP_038305.1
31	29478	29660	36	60	7.3	6.2	<u>CAAGAGGATGA</u>_{TGTT}ATG	-	ORF32, Abc2	60/60(100%)	YP_003347441.1
32	29788	30444	37	218	25	6.2	<u>AAAAGAGGATA</u>_{TGAC}ATG	Proteína tipo ERF	ORF33, Abc2	217/218(99%)	YP_003347442.1
33	30447	31418	39	323	37.7	5.1	<u>AACGGAAGGGA</u>_{TAAAT}ATG	-	ORF34, Abc2	323/323(100%)	YP_003347443.1
34	31415	31867	42	150	17	5.8	<u>AAAGGAGAAAA</u>_{CAA}ATG	Proteína de unión a ssADN	ORF35, Abc2	149/150(99%)	YP_003347444.1
35	31877	32338	38	153	18	9.5	<u>TAAGGTGAAAC</u>_TATG	-	ORF36, Abc2	153/153(100%)	YP_003347445.1
36	32336	32571	37	78	9.2	6.1	<u>CAAGGAGTTGGA</u>ATG	-	ORF37, Abc2	72/78(92%)	YP_003347446.1
37	32562	32735	41	57	6.5	7.9	<u>GAAAGAGATGA</u>_{TAGAACT}ATG	-	ORF42, 858	53/57(93%)	YP_001686836.1
38	32732	32887	28	51	6.3	6.0	<u>GTAGGAGATTA</u>_{GTAGAGTT}ATG	-	ORF40, DT1	48/51(94%)	NP_049428.1
39	32898	33011	37	37	4	5.8	<u>ATAGATGGCAA</u>_{GAT}ATG	-	ORF20, TP-J34	20/25(80%)	YP_007392267.1
40	33016	33228	34	70	8	5.2	<u>GAAGGGATAGA</u>_{ATA}ATG	-	ORF41, DT1	69/70(99%)	NP_049429.1
41	33215	33763	36	182	33.7	5.2	<u>CTAGGAGAAGA</u>_{AA}ATG	-	ORF22, TP-J34	131/181(72%)	YP_007392269.1
42	33764	34270	38	168	19.1	5.4	<u>GACAGAGGTGG</u>_{AATAG}ATG	Proteína de unión al ADN	ORF43, Abc2	158/168(94%)	YP_003347452.1
43	34245	34547	39	100	11.1	9.4	<u>AAAGGAATAAT</u>_{GATTG}ATG	-	ORF43, DT1	99/100(99%)	NP_049431.1
44	34544	35251	38	235	27.5	9.2	<u>AAAGGAAGAGG</u>_{GCA}ATG	-	ORF236, Sfi11	195/233(84%)	NP_056722.1
45	35611	36009	39	132	15.5	8.9	<u>AAAGGAAAGAC</u>_{AATTT}ATG	-	ORF45, DT1	132/132(100%)	NP_049433.1
46	36121	36639	47	172	20	9.7	<u>AGAGGAGGGAA</u>_{GCCA}ATG	HNH endonucleasa	ORF48, Abc2	172/172(100%)	YP_003347457.1

*El resultado del BLAST muestra que se trata de una secuencia del genoma de *S. thermophilus*.

29	25034	25324	33	98	11.1	9.6	AAAGGAGAGAA ^{TAAT} ATG	-	*1	59/95(62%)	ZP_11415306.1
30	25352	25903	38	183	21.3	6.7	AAAGGAAGTAA ^{ACAAA} ATG	-	ORF183, Sfi11	165/183(90%)	NP_056701.1
31	25987	26202	30	71	8.8	9.1	AAAGGTTTAAC ^{TGAT} ATG	-	ORF71, Sfi11	66/71(93%)	NP_056703.1
32	26224	26661	25	145	17.4	4.8	AGAAGAAATGG ^{TATTTAAT} ATG	-	ORF53, O1205	144/145(99%)	NP_695131.1
33	26913	27116	37	67	7.6	9.7	AAAGGAGGAAC ^{AAAA} ATG	Regulador tipo Cro	ORF5, TP-J34	56/67(84%)	YP_007392252.1
34	27157	27831	38	224	26	6.4	AAAGGAACAAGATG	-	ORF24, Abc2	102/194(53%)	YP_003347433.1
35	28115	28324	44	69	8.1	6.6	AAAGGAGAGAA ^{TCTC} ATG	-	*2	62/69(90%)	ZP_12802261.1
36	28337	29083	33	248	29	9.2	AAAGGGTAATA ^c ATG	Antirreceptor viral	ORF17, YMC-2011*3	158/248(64%)	YP_006561235.1
37	29275	29466	35	64	8	9.8	AAAGGAAAATA ^{CT} ATG	-	ORF22, YMC-2011 *4	27/45(60%)	YP_006561238.1
38	29735	30640	37	301	34.7	5.9	GGAGAGGGTGA ^{GTCTAAA} ATG	Proteína componente del primosoma	ORF10, TP-J34	271/301(90%)	YP_007392257.1
39	30652	31434	40	260	30.3	7.7	TGAGGGGATT ^{CCT} ATG	Proteína tipo DnaC	ORF11, TP-J34	243/260(93%)	YP_007392258.1
40	31431	31613	36	60	7.3	6.2	ATAAGAGGATG ^{ATGTT} ATG	-	ORF32, Abc2	60/60(100%)	YP_003347441.1
41	31741	32397	37	218	25	6.2	AAAAAGGGATA ^{TGAC} ATG	Proteína tipo ERF	ORF33, Abc2	218/218(100%)	YP_003347442.1
42	32400	33371	38	323	37.7	5.0	AACGGAAGGGATAAATATG	-	ORF34, Abc2	322/323(99%)	YP_003347443.1
43	33368	33814	42	148	16.6	5.8	AAAGGAGAAAA ^{CAA} ATG	Proteína de unión a ssADN	ORF35, Abc2	141/150(94%)	YP_003347444.1
44	33824	34285	40	153	17.9	9.2	TTCTAAGGTGA ^{AACT} ATG	-	ORF16, TP-J34	150/153(98%)	YP_007392263.1
45	34282	34518	35	78	9.1	7.8	AAAGGAGCTGG ^A ATG	-	ORF37, Abc2	75/78(96%)	YP_003347446.1
46	34509	34679	40	56	6.3	9.5	GAAAGAGATGA ^{TAGAACT} ATG	-	ORF18, TP-J34	47/56(84%)	YP_007392265.1
47	34676	34831	30	51	6.4	6.0	CAAGGAGATTA ^{GTAGATT} ATG	-	ORF8, 5093	48/50(96%)	YP_002925091.1
48	34832	35314	36	160	19.7	5.4	GGAAGAGGTAA ^{ATTAA} ATG	-	ORF15, 7201	127/149(85%)	NP_038316.1
49	35348	35872	35	174	20.8	5.5	TAAAGAGGTGA ^{CAGAA} ATG	-	ORF178, Sfi11	81/177(46%)	NP_056719.1
50	35985	36497	40	170	19.4	6.5	TTTGGAGGGAA ^{TAGCAA} GTTG	Proteína de unión al ADN	ORF10, 5093	161/170(95%)	YP_002925093.1
51	37099	37386	42	95	10.5	9.1	TTGCGAGGTAT ^{TT} ATG	-	ORF44, Abc2	67/94(71%)	YP_003347453.1
52	37383	37769	34	128	14.7	4.5	AAAGGAAGAGG ^{ACA} ATG	Proteína YopX	ORF23, phiS10*5	60/127(47%)	AGF87672.1
53	38068	38634	36	188	21.9	9.8	AAATGAGGTTG ^{GCTAA} TTG	Endoncleasa HNHc	ORF12, Micobacterium phage Museum*6	37/126(29%)	YP_008050777.1
54	38592	38876	32	94	11	9.8	AATTGCAATAG ^{CAAAAA} ATG	-	*7	36/78(46%)	ZP_22323903.1
55	38934	39641	37	235	27.5	8.9	TCGAGGAGTGA ^{GAAAC} ATG	-	ORF46, 858	193/235(82%)	YP_001686840.1
56	40147	40563	44	138	16.2	9.1	GAGAGGGCAGA ^{ACA} ATG	Regulador transcripcional	ORF13, 5093	134/138(97%)	YP_002925096.1

*1: *Streptococcus* spp. F0441

*2: *Streptococcus pneumoniae* GA17971*3: *Streptococcus salivarius*phage

*4: *Streptococcus salivarius*phage*5: *Streptococcus suis*phage

*6: *Micobacterium*phage*7: *Streptococcus agalactiae* FSL S3-277

28	25590	26336	34	248	28.8	9.7	AAAGGGTAATAcATG	Antirrepresor profago LambdaSa1	YNC-2011	158/248(64%)	YP_006561235.1
29	26850	26996	37	48	5.7	11.4	AAACTACCTTTTTTTAAAAATG	-	-	-	-
30	27043	27849	34	268	31.5	9.1	AAAGAGAGAGATAAGATTAATG	Proteína con dominio DnaD	ORF4, 7201	231/268(86%)	NP_038304.1
31	27862	28644	41	260	30.4	8.4	CTAAGAGGTTCTTTATATG	Proteína tipo DnaC	ORF31, Abc2	237/260(91%)	YP_003347440.1
32	28641	28838	37	65	7.8	5.6	CAAGAGGATGATGCTATG	-	ORF6a, 7201	48/60(80%)	NP_038306.1
33	28963	29781	40	272	30.4	4.5	AAAGGAAGACAAGACATG	Proteína de reparación de ADN recombinante	phi30c	161/263(61%)	AGF87389.1
34	29783	30619	38	278	32.5	6.6	CAAAGAGGTATAAAATG	-	phi5218	167/272(61%)	AGF87458.1
35	30659	31303	34	214	25.9	5.8	AAATGAGGTAAACAATG	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	120/211(57%)	YP_003413443.1
36	31318	31764	45	148	16.5	5.2	AAAGGAGAAAAATAATG	Proteína de unión a ssADN	ORF9, 7201	134/148(91%)	NP_038310.1
37	31782	32243	40	153	18	10	GAAGTTGATGAGTTATG	-	ORF36, Abc2	143/153(93%)	YP_003347445.1
38	32240	32482	36	80	9.5	8.5	CAAGGAGCTGGAATG	-	ORF37, Abc2	73/77(95%)	YP_003347446.1
39	32467	32625	29	52	6.4	5	GAAAGAGATGATAGAACTATG	-	ORF40, DT1	48/51(94%)	NP_049428.1
40	32622	32939	29	105	12.2	10.3	GAAATGGTTGAGGTAGATGAATG	-	ORF40, Abc2	105/105(100%)	YP_003347449.1
41	32968	33351	31	126	14.4	8.4	ATTGGAGAAATATAATG	-	ORF41, Abc2	126/127(99%)	YP_003347450.1
42	33363	33863	35	166	20.2	5.2	TAAGGAGAACTAGAAATG	-	ORF178,Sfi11	103/168(61%)	NP_056719.1
43	33864	34376	38	170	19.5	6.5	TGAAGAGGTAGAATAGATG	Proteína de unión al ADN	ORF10, 5093	159/170(94%)	YP_002925093.1
44	34345	34647	40	100	11.1	9.9	AAAGGGAAAAATGATAAATG	-	ORF42, ALQQ3.2	69/93(74%)	YP_003344888.1
45	34651	35358	37	235	27.7	9.4	TGAGGAGTTATTAAGACATG	-	ORF235, Sfi18	226/235(96%)	AAF63098.1
46	35818	36216	39	132	15.5	9.3	AAAGGAAAGACAATTTATG	-	ORF45, DT1	131/132(99%)	NP_049433.1
47	36320	36844	47	174	20.2	9.7	TCTAAAGGAGGcATG	-	ORF20, 7201	166/172(97%)	NP_038321.1

							a NTP				
28	26362	27693	40	443	50.2	7.7	<u>AGAAGAGGTCT</u> _{TCAATT} <u>TTG</u>	Helicasa	ORF33, DT1	415/443 (94%)	NP_049421.1
29	27700	28155	36	151	17.3	4.9	<u>TATGGAGATAA</u> _{AAAACT} <u>ATG</u>	Proteína de la familia DUF 669	ORF36, ALQ13.2	151/151 (100%)	YP_003344882.1
30	28158	28973	41	271	30.5	5.4	<u>AATTGACCTTC</u> _{CATTCTAATT} <u>ATG</u>	Proteína de replicación	ORF271, Sfi21	267/271 (99%)	NP_050001.1
31	28960	30471	37	503	58.8	7.7	<u>TAAGGAGGATT</u> _{GGAC} <u>TTG</u>	Primasa	ORF36, DT1	487/491 (99%)	NP_049424.1
32	30898	31221	38	107	12.1	9.6	<u>TTGCGAGCATT</u> _{TATAAGGA} <u>ATG</u>	Proteína con dominio VRR_NUC	ORF38, DT1	99/107 (93%)	NP_049426.1
33	31202	31444	37	80	9.5	9.1	<u>ACTGGAGATAG</u> _{TTG} <u>ATG</u>	-	ORF39, DT1	71/79 (90%)	NP_049427.1
34	31435	31608	36	57	6.5	9.5	<u>GAAAGAGATGA</u> _{TAGAACT} <u>ATG</u>	-	ORF38, Abc2	49/57 (86%)	YP_003347447.1
35	31605	31760	26	51	6.3	6.7	<u>GAAGGAGATTA</u> _{GTAGATTT} <u>ATG</u>	-	ORF43, 2972	47/51 (92%)	YP_238524.1
36	31761	32258	37	165	19.0	5.5	<u>GGTTGAGGTAG</u> _{AATAA} <u>ATG</u>	Proteína de unión al ADN	ORF42, DT1	160/165 (97%)	NP_049430.1
37	32230	32511	39	93	10.4	9.6	<u>AAAGGAGTAAT</u> _{GA} <u>TTG</u>	Proteína de la familia DUF 1372	ORF42, ALQ13.2	71/98 (72%)	YP_003344888.1
38	32508	33215	40	235	28.0	9.4	<u>AAAGGGAGGGG</u> _{ACA} <u>ATG</u>	-	ORF43, ALQ13.2	226/235 (96%)	YP_003344889.1
39	33482	33880	37	132	15.4	9.3	<u>AAAGGAAAGAC</u> _{AATTT} <u>ATG</u>	Proteína de la familia DUF 1492	ORF132, Sfi19	131/132 (99%)	NP_049923.1
40	33990	34499	48	169	19.5	9.5	<u>AAAGGAGGCAT</u> _{GCCA} <u>ATG</u>	HNH endonucleasa	ORF20, 7201	161/172 (94%)	NP_038321.1

*Todos fagos de *S. thermophilus*, excepto *S. salivarius* YMC-2011 y *S. suis* phiNJ2

Tabla 34: Comparación mediante BLAST de las proteínas del fago ϕ 53 con el resto de las proteínas de fagos uruguayos. En celeste se marcan aquellas cuyo similitud con una proteína de fago uruguayo es mayor que con una proteína de fago extranjero

Fago ϕ 53		
ORF	BLAST con fagos uruguayos	% Identidad (aa)
1	ORF1, p128	143/151(95%)
2	-	-
3	ORF2, p73	512/624(82%)
4	ORF3, p73 & p128	57/59(97%)
5	ORF4, p107	378/386(98%)
6	ORF5, p128	222/222(100%)
7	ORF6, p73	396/397(99%)
8	ORF7, p73 & p107 & p128	104/104(100%)
9	ORF8, p73	114/116(98%)
10	ORF9, p73 & p107	140/140(100%)
11	ORF10, p73	123/123(100%)
12	ORF11, p73	202/202(100%)
13	ORF12, p73	117/117(100%)
14	ORF13, p73	1631/1656(98%)
15	ORF14, p73	514/519(99%)
16	ORF15, p107	*1
17	ORF16, p73	539/565(95%)
18	ORF21, p93	115/135(85%)
19	ORF22, p93	47/48(98%)
20	ORF19, p73	92/103(89%)
21	ORF20, p73	77/80(96%)
22	ORF21, p73	254/281(90%)
23	-	-
24	ORF25, p107	28/31(90%)
25	ORF26, p107	75/75(100%)
26	ORF34, p93	90/94(96%)
27	ORF33, p93	61/67(91%)
28	ORF25, p128	40/44(91%)
29	-	-
30	ORF27, p128	214/222(96%)
31	ORF28, p128	415/443(94%)
32	ORF29, p128	147/151(97%)
33	ORF30, p128	264/271(97%)
34	ORF31, p128	481/502(96%)
35	ORF32, p128	101/107(94%)
36	ORF33, p128	71/79(90%)
37	ORF43, p107	98/109(90%)
38	ORF44, p107	87/98(89%)
39	ORF38, p128	198/235(84%)
40	ORF45, p73	132/132(100%)
41	ORF46, p73	168/172(98%)

*1: 1-689: 557/751(74%); 445-860: 210/464(45%)

Tabla 35: Comparación mediante BLAST de las proteínas del fago $\phi 73$ con el resto de las proteínas de fagos uruguayos. En celeste se marcan aquellas cuyo similitud con una proteína de fago uruguayo es mayor que con una proteína de fago extranjero

Fago $\phi 73$		
ORF	BLAST con fagos uruguayos	% Identidad (aa)
1	ORF1 p107	138/152(90%)
2	ORF3, p53	512/624(82%)
3	ORF3, p128	59/59(100%)
4	ORF5, p53	380/386(98%)
5	ORF5 p107	222/222(100%)
6	ORF7, p53	396/397(99%)
7	ORF8, p53	104/104(100%)
8	ORF8, p128	116/116(100%)
9	ORF10, p53	140/140(100%)
10	ORF11, p53	123/123(100%)
11	ORF12, p53	202/202(100%)
12	ORF13, p53	117/117(100%)
13	ORF14, p53	1643/1656(99%)
14	ORF15, p53	515/519(99%)
15	ORF16, p53	471/543(86%)
16	ORF17, p53	547/565(96%)
17	ORF18, p53	108/136(79%)
18	ORF22, p93	41/48(85%)
19	ORF19, p128	105/107(98%)
20	ORF21, p53	78/80(97%)
21	ORF22, p53	267/281(95%)
22	ORF30, p93	181/183(98%)
23	-	-
24	ORF33, p93	66/67(98%)
25	ORF34, p93	198/219(90%)
26	ORF6, p128	42/100(42%)
27	ORF24, p128	68/69(98%)
28	ORF28, p53	40/47(85%)
29	ORF31, p107	263/269(97%)
30	ORF39, p93	248/260(95%)
31	ORF40, p93	60/60(100%)
32	ORF41, p93	217/218(99%)
33	ORF42, p93	323/323(100%)
34	ORF43, p93	145/150(96%)
35	ORF44, p93	150/153(98%)
36	ORF45, p93	73/78(93%)
37	ORF46, p93	56/57(98%)
38	ORF40, p107	51/51(100%)
39	ORF46, p107	15/36(41%)
40	-	-
41	ORF43, p107	111/183(60%)
42	ORF36, p128	162/168(96%)
43	ORF37, p128	84/100(84%)
44	ORF46, p107	214/235(91%)
45	ORF40, p53	132/132(100%)
46	ORF41, p53	168/172(97%)

Tabla 36: Comparación mediante BLAST de las proteínas del fago $\phi 93$ con el resto de las proteínas de fagos uruguayos. En celeste se marcan aquellas cuyo similitud con una proteína de fago uruguayo es mayor que con una proteína de fago extranjero

Fago $\phi 93$		
ORF	BLAST con fagos uruguayos	% Identidad (aa)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	ORF14, p107	270/446(61%)
19	ORF15, p107	779/1305(60%)
20	ORF16, p128	566/687(82%)
21	ORF18, p53	15/135(85%)
22	ORF19, p53	47/48(98%)
23	ORF19, p128	98/104(94%)
24	ORF21, p107	71/80(89%)
25	ORF21, p128	183/199(92%)
26	ORF23, p107	49/54(91%)
27	ORF24, p107	71/75(95%)
28	-	-
29	-	-
30	ORF22, p73	174/183(95%)
31	-	-
32	-	-
33	ORF24, p73	63/67(94%)
34	ORF25, p73	184/219(84%)
35	-	-
36	ORF28, p107	248/248(100%)
37	-	-
38	-	-
39	ORF31, p107	244/260(94%)
40	ORF31, p73	60/60(100%)
41	ORF32, p73	217/218(99%)
42	ORF33, p73	322/323(99%)
43	ORF34, p73	140/150(93%)
44	ORF35, p73	147/153(96%)
45	ORF36, p73	73/78(94%)
46	ORF37, p73	50/57(88%)
47	ORF35, p128	45/50(90%)
48	ORF42, p107	76/150(51%)
49	ORF41, p73	76/161(47%)
50	ORF43, p107	157/170(92%)

51	ORF43, p73	66/94(70%)
52	-	-
53	-	-
54	-	-
55	ORF46, p107	183/235(78%)
56	-	-

Tabla 37: Comparación mediante BLAST de las proteínas del fago ϕ 107 con el resto de las proteínas de fagos uruguayos. En celeste se marcan aquellas cuyo similitud con una proteína de fago uruguayo es mayor que con una proteína de fago extranjero

Fago ϕ 107		
ORF	BLAST con fagos uruguayos	% Identidad (aa)
1	ORF1, p128	144/153(94%)
2	ORF2, p128	222/229(97%)
3	ORF2, p128	332/339(98%)
4	ORF4, p72 & p73 & p128	376/386(97%)
5	ORF5, p72 & p73	222/222(100%)
6	ORF6, p72 & p73	396/397(99%)
7	ORF7, p72 & p73 & p128; ORF8, p53	104/104(100%)
8	ORF8, p73 & p128	116/116(100%)
9	ORF9, p73 & p128; ORF10, p53	140/140(100%)
10	ORF10, p128	118/123(96%)
11	ORF11, p73; ORF12, p53	192/202(95%)
12	ORF12, p128	114/117(97%)
13	ORF13, p73	1381/1656(83%)
14	ORF15, p53	493/519(95%)
15	ORF19, p93	779/1305(60%)
16	ORF20, p93	511/578(88%)
17	ORF18, p53	86/120(72%)
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	ORF24, p93	71/80(89%)
22	ORF22, p53	187/198(94%)
23	-	-
24	ORF22, p53	72/75(96%)
25	ORF24, p53	28/31(90%)
26	ORF25, p53	75/75(100%)
27	ORF23, p128	230/230(100%)
28	ORF36, p93	248/248(100%)
29	-	-
30	ORF29, p73	257/269(96%)
31	ORF39, p93	244/260(94%)
32	ORF31, p73; ORF40, p93	46/58(79%)
33	-	-
34	-	-
35	-	-
36	ORF43, p93	133/148(90%)
37	ORF35, p73	143/153(93%)
38	ORF45, p93	70/77(91%)
39	ORF38, p73	49/51(96%)
40	-	-
41	-	-
42	ORF41, p73	86/183(47%)
43	ORF50, p93	157/170(92%)
44	ORF38, p53	87/98(89%)
45	ORF44, p73	198/235(84%)
46	ORF40, p53; ORF45, p73	131/132(99%)
47	ORF46, p73	161/172(94%)

Tabla 38: Comparación mediante BLAST de las proteínas del fago ϕ 128 con el resto de las proteínas de fagos uruguayos. En celeste se marcan aquellas cuyo similitud con una proteína de fago uruguayo es mayor que con una proteína de fago extranjero

Fago ϕ 128		
ORF	BLAST con fagos uruguayos	% Identidad (aa)
1	ORF1, p53	143/151(95%)
2	ORF2, p72	605/623(97%)
3	ORF3, p72 & p73	59/59(100%)
4	ORF4, p72 & p73	386/386(100%)
5	ORF6, p53	222/222(100%)
6	ORF6, p107; ORF7, p53	393/397(99%)
7	ORF7, p72 & p73 & p107; ORF8, p53	104/104(100%)
8	ORF8, p73, p107	116/116(100%)
9	ORF9, p72 & p73; ORF10, p53	140/140(100%)
10	ORF10, p72 & p73; ORF11, p53	121/123(98%)
11	ORF11, p72 & p73; ORF12, p53	197/203(97%)
12	ORF12, p107	114/117(97%)
13	ORF13, p107	1362/1624(84%)
14	ORF14, p72 & p73	421/527(80%)
15	ORF15, p107	*
16	ORF20, p93	566/687(82%)
17	ORF21, p93	116/132(88%)
18	ORF22, p93	38/48(79%)
19	ORF19, p72 & p73	101/107(94%)
20	ORF24, p93	69/80(86%)
21	ORF22, p53	251/281(89%)
22	ORF24, p72 & p73	60/67(90%)
23	ORF27, p107	230/230(100%)
24	ORF27, p72 & p73	68/69(99%)
25	ORF28, p53	40/44(91%)
26	-	-
27	ORF30, p53	214/222(96%)
28	ORF31, p53	415/443(94%)
29	ORF32, p53	147/151(97%)
30	ORF33, p53	264/271(97%)
31	ORF34, p53	481/502(96%)
32	ORF35, p53	101/107(94%)
33	ORF36, p53	71/79(90%)
34	ORF46, p93	49/57(86%)
35	ORF47, p93	45/50(90%)
36	ORF42, p72 & p73	152/168(90%)
37	ORF43, p72 & p73	75/100(75%)
38	ORF39, p53	198/235(84%)
39	ORF46, p107	126/132(95%)
40	ORF47, p107	163/172(95%)

*: 1-501:471/501(94%); 679-1059: 301/381(79%)

Los resultados del análisis de las tablas (Tablas 29 a 38) de anotación, muestran que estos fagos aislados en Uruguay no presentan muchas diferencias con los presentes en la base de datos del NCBI. Las proteínas presentes únicamente en fagos uruguayos son muy pocas, reduciéndose a los ORFs 23 y 24 de $\phi 53$ y los ORFs 25 y 29 de $\phi 107$. El ORF 24 de $\phi 53$ y 25 de $\phi 107$ poseen la misma secuencia, por lo que podemos afirmar que se trata de la misma proteína. Esto reduce el número de proteínas únicamente encontradas en fagos uruguayos a tres. Estas son proteínas hipotéticas y no poseen ningún dominio conservado, por lo tanto no es posible en esta instancia establecer cuál es su función.

Tampoco se observa en ninguno de los fagos analizados genes codificados en la hebra complementaria. Por lo general según se puede observar en otros genomas de fagos de *S. thermophilus*, los genes codificados en la hebra complementaria están asociados a la lisogenia (no quiere decir que todos los genes involucrados en el ciclo lisogénico estén codificados en la hebra complementaria). Ninguno de los fagos estudiados posee genes asociados al ciclo lisogénico, por lo que podemos concluir que en todos los casos se trata de virus estrictamente virulentos.

Otro dato interesante, es que parece no haber una relación estrecha entre los fagos uruguayos. Los fagos nacionales no forman un agrupamiento a nivel de secuencias proteicas que los distancie de otros fagos aislados en diferentes partes del mundo. Esto puede observarse en las Tablas 34, 35, 36, 37 y 38. En ningún caso, el número de proteínas que presenta una similitud mayor a otra proteína de otro fago uruguayo que a la de un fago extranjero, supera el 50% de la totalidad de proteínas. Este resultado descarta el ya improbable escenario de un solo ancestro común a todos los fagos nacionales. Es más, teniendo en cuenta un modelo evolutivo más realista en que los genes virales representan un *pool* común y que los fagos se componen de módulos genéticos que se intercambian por recombinación homóloga, o se ganan y pierden por recombinación ilegítima, podemos hipotetizar que este *pool* aún no ha divergido lo suficiente como para diferenciarse de otras poblaciones. Esto puede deberse a que no ha transcurrido el tiempo suficiente o que el flujo de nuevo material genético al sistema es lo suficientemente grande como para que no pueda considerarse a la población de fagos nacionales como una población aislada. Esta introducción puede darse por ejemplo, con la importación de iniciadores contaminados, como hemos podido comprobar en este mismo trabajo. Un ejemplo de esto, es el caso del fago $\phi 53$, el cual ha sido introducido en el ambiente industrial nacional a través de un lote de inóculos contaminados provenientes de Argentina.

Representación gráfica de los genomas

Las representaciones gráficas de los genomas son una herramienta más en el análisis comparativo de los fagos. Estas permiten analizar de forma visual la organización de los genomas y las relaciones de homología entre genes de los mismos. Se presentan dos figuras: una en la que se comparan los genomas de fagos tipo *cos* (Figura 58) y otra para el análisis de genomas de fagos tipo *pac* (Figura 59). En la confección de las figuras, se incluyeron fagos control, los cuales están anotados en GenBank. Los fagos tipo *cos* elegidos fueron el fago DT1, fago de referencia, y el fago Abc2, fago aislado en Argentina. Los fagos tipo *pac* elegidos fueron el fago de referencia 2972, y el fago ALQ13.2, también aislado en Argentina. Las figuras permiten visualizar la organización modular de los genomas. Los diferentes módulos, agrupan genes cuyas funciones están asociadas. A pesar de la gran cantidad de genes cuya función es desconocida, a grandes rasgos puede establecerse la posición de los diferentes módulos en los genomas, gracias a aquellos genes cuya función es conocida.

A grandes rasgos podemos establecer que entre el extremo del genoma y las 20.000 pb se encuentran las proteínas estructurales del virus. Entre las 20.000 y 25.000 pares de bases se encuentra el módulo de lisis, integrado por genes cuyas funciones están asociadas a la liberación de la progenie al exterior. Entre las 25.000 y 30.000 se encuentran los genes involucrados en la replicación del genoma viral, y desde las 30.000 pb en adelante se encuentran genes involucrados en la regulación de la transcripción.

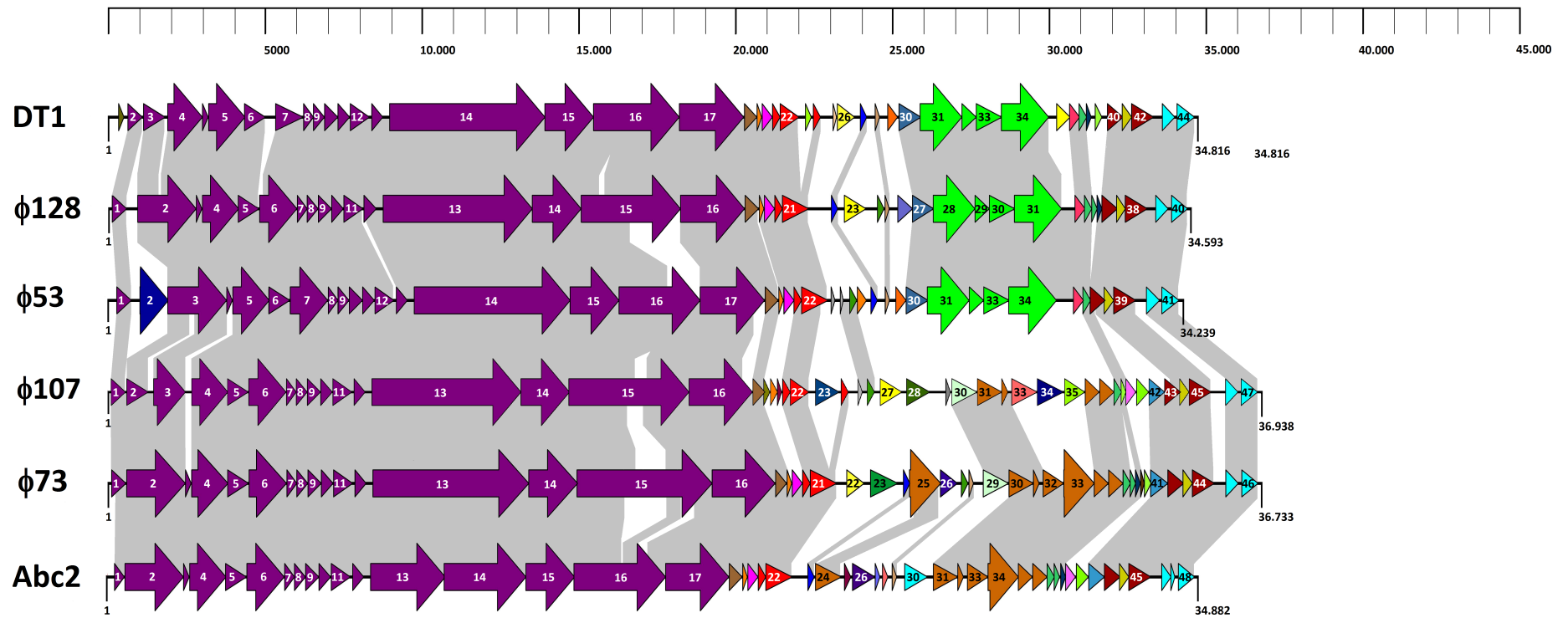


Figura 58: Representación gráfica y comparación de genomas de fagos tipo *cos*. Las conexiones de color gris unen aquellas regiones que son homologas entre genomas.

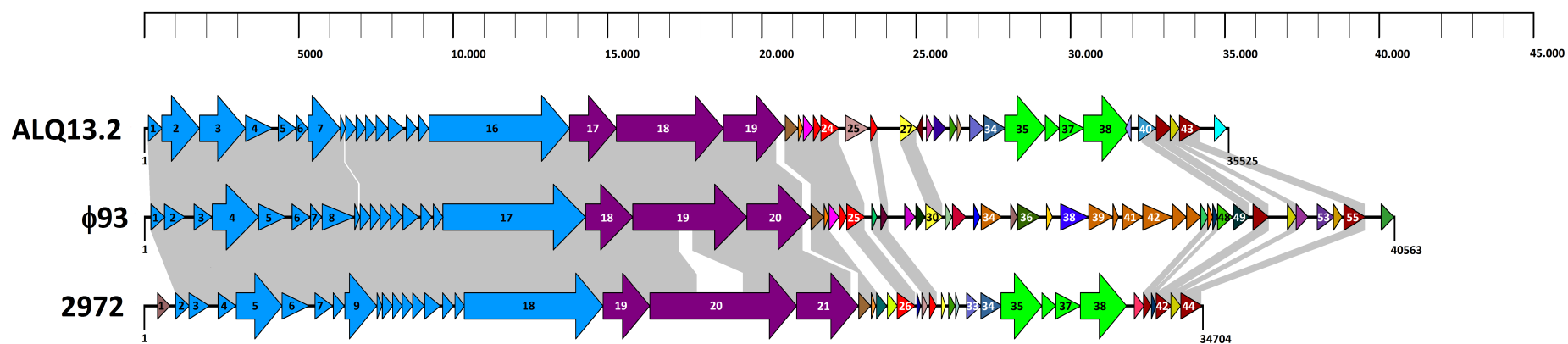


Figura 59: Representación gráfica y comparación de genomas de fagos tipo *pac*. Las conexiones de color gris unen aquellas regiones que son homologas entre genomas.

Selección de resistentes

El proceso de obtención de cepas resistentes comenzó con el establecimiento de los criterios que las nuevas cepas debían cumplir para ser consideradas clones resistentes con potencial para su uso industrial. Los criterios elegidos fueron dos:

1. Luego del proceso de selección, la cepa obtenida debía presentar a diferencia de la cepa madre, un fenotipo resistente al o los bacteriófagos utilizados en el ensayo.
2. La cepa obtenida debía presentar un comportamiento similar al de la cepa madre al crecer cultivada en leche.

El comportamiento de la cepa al crecer en leche es una de las características tecnológicas más importantes en la producción de quesos. Fermentaciones demasiado lentas conllevan retrasos en la producción y pérdida en la calidad del producto. Para poder comparar el crecimiento de las cepas en leche, se diseñó un protocolo al que denominamos fermentación estándar. Este protocolo (ver materiales y métodos) consiste básicamente en monitorear el descenso de pH en un cultivo durante intervalos regulares, partiendo siempre de la misma concentración inicial de microorganismos durante similar período de tiempo.

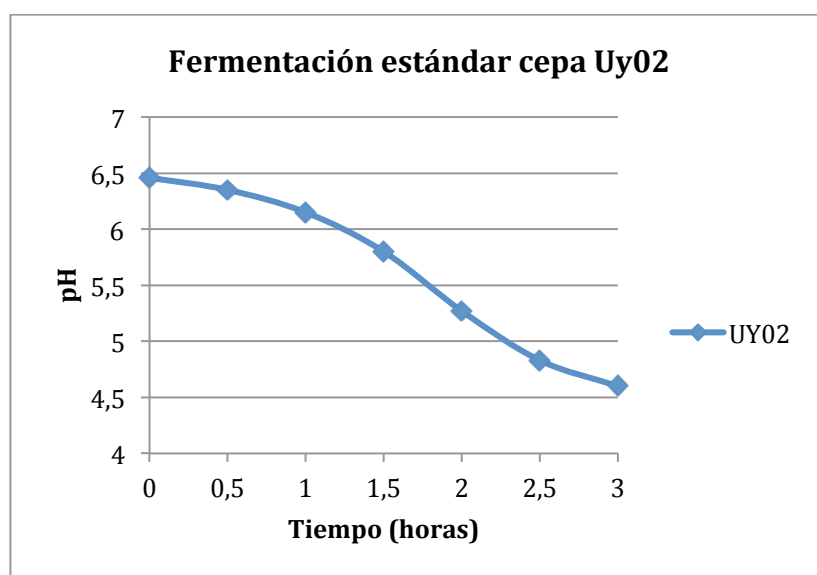
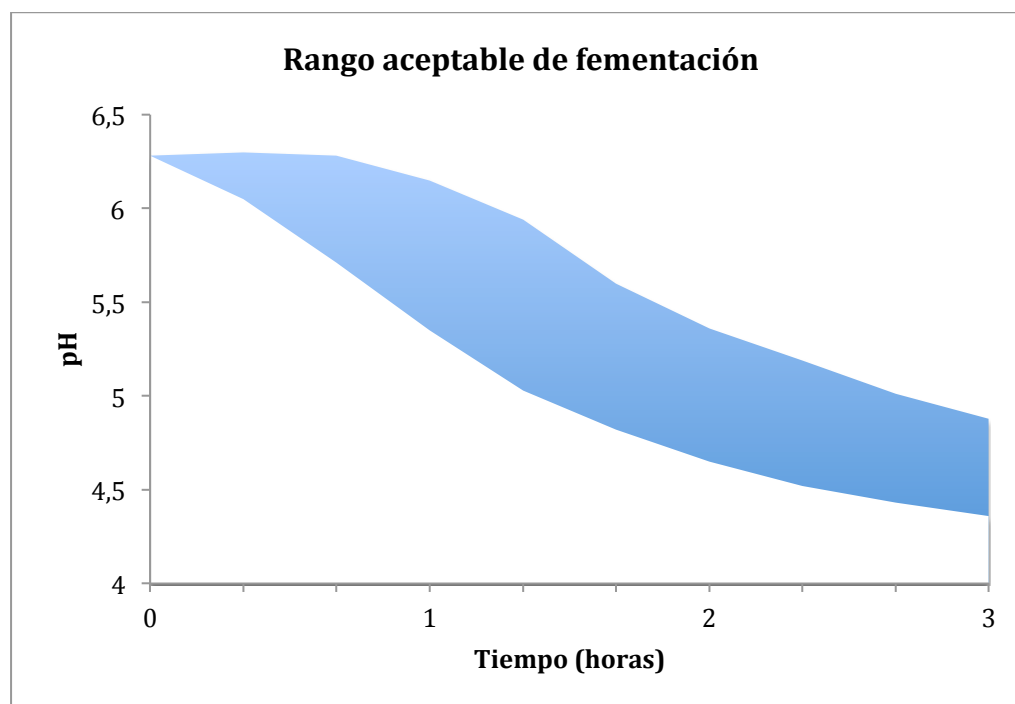
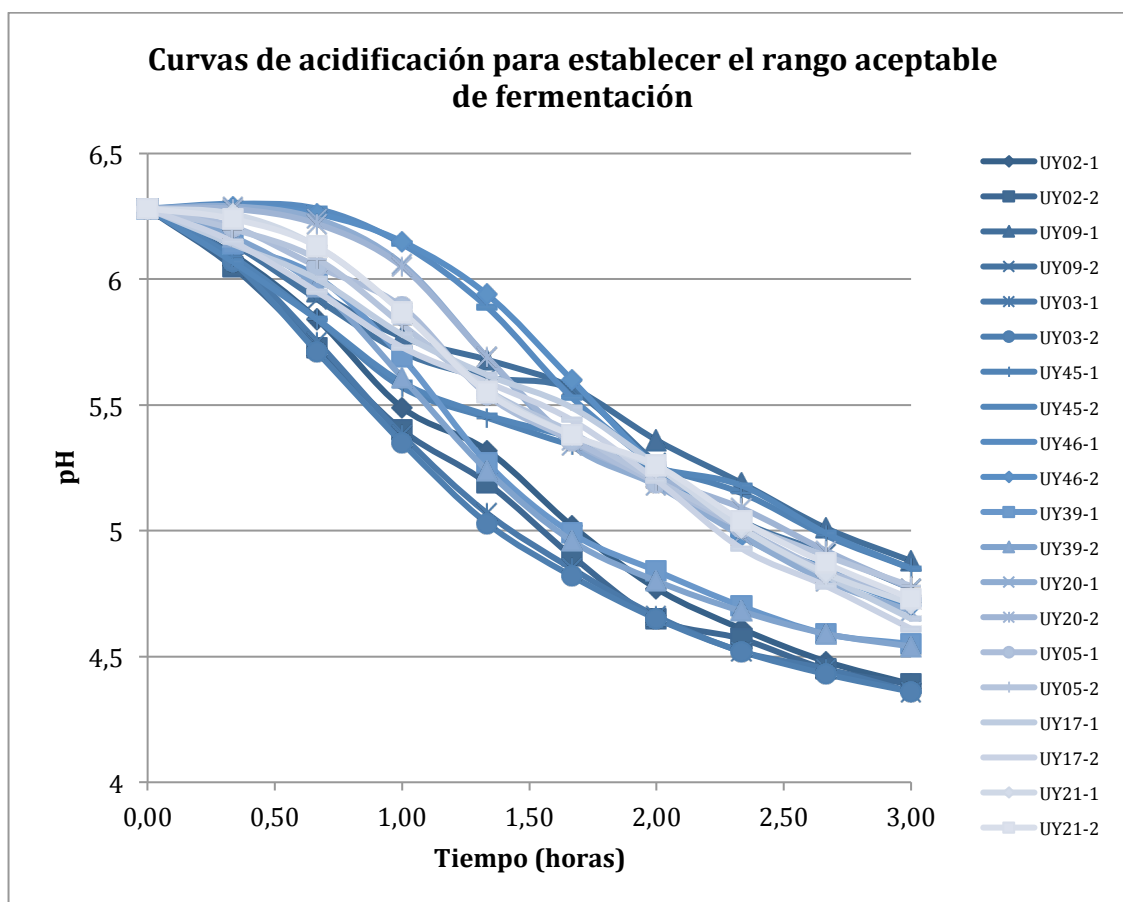


Figura 60: Fermentación estándar utilizando la cepa Uy02

Un resultado con el que nos encontramos, fue que algunas de las cepas obtenidas cumplían el primer criterio, pero no cumplían el segundo, ya que los perfiles de acidificación o fermentaciones estándar no eran exactamente iguales a los de la cepa madre. Esto representaba un inconveniente, ya que siguiendo los criterios de selección, estas cepas debían ser descartadas, pero tal vez podríamos estar

descartando cepas potencialmente utilizables como iniciadores industriales. Para reducir este posible “descarte innecesario”, decidimos establecer lo que llamamos un rango aceptable de fermentación. Para determinar cual era este rango, se utilizaron las cepas que fueron consideradas las mejores cepas, según parámetros asociados tecnológicos y comerciales, estudio que no forma parte de este proyecto, pero características bien conocidas por la empresa proveedora de las cepas. Esta selección fue llevada a cabo junto con la empresa proveedora BIOMÁS S.A., obteniéndose un set de 10 cepas (ver Anexo 1). El rango aceptable de fermentación fue obtenido al realizar simultáneamente (en cultivos separados) fermentaciones estándar de las 10 cepas por duplicado. Las fermentaciones fueron llevadas a cabo simultáneamente, con el mismo lote de leche en polvo y el material esterilizado simultáneamente para evitar posibles sesgos. Las 20 curvas obtenidas se condensaron en una sola gráfica, obteniéndose el rango aceptable de fermentación. Los valores de pH para este ensayo fueron tomados cada 20 minutos y no cada media hora, para obtener una mayor precisión en los resultados (Figura 61).

En resumen, lo que este rango permite es evaluar si una cepa resistente que no se comporta de forma similar a la cepa madre aún tiene potencial para ser utilizada a nivel industrial. Si la cepa obtenida no se comporta como su cepa madre ni su perfil de acidificación se encuentra dentro del rango establecido (Figura 62), la cepa es descartada con mayor confianza.



Obtención de resistentes

La generación de clones resistentes fue llevada a cabo siguiendo los protocolos detallados en materiales y métodos. En la primera etapa de obtención de resistentes, se utilizó el método de generación en medio líquido para luego en los ensayos finales utilizar el método de generación de resistentes en medio sólido al comprobarse que éste era igualmente efectivo pero más económico en recursos y tiempo.

Para estos ensayos, se seleccionaron al azar seis cepas diferentes de la colección, y se procedió a generar nuevas cepas que fueran resistentes a todos los fagos a los que fueran sensibles. Existe una excepción en el caso de la cepa Uy02 de la cual los resistentes obtenidos son sensibles al fago $\phi 142$ pues al momento de realizar los ensayos este fago aún no había sido aislado. De estos ensayos, se obtuvieron un total de 20 nuevas cepas resistentes, de las cuales dos fueron descartadas utilizando el criterio del rango aceptable de fermentación (explicado más adelante). En la Tabla 39 se detallan las cepas elegidas de la colección, las resistentes obtenidas y los fagos que fueron utilizados en los ensayos. La resistencia de las nuevas cepas fue evaluada mediante ensayos de sensibilidad resistencia en medio sólido según se explica en materiales y métodos.

Tabla 39: Obtención de cepas resistentes. En rojo se marcan aquellas que fueron descartadas por no cumplir el segundo criterio de selección

Cepa madre	Fagos	Resistente
Uy02	$\phi 128, \phi 131$	SBQ48T1
		SBQ48T2
		SBQ48T3
Uy03	$\phi 73$	SBQ18T1
		SBQ18T2
		SBQ18T3
		SBQ18T4
		SBQ18T5
Uy04	$\phi 107, \phi 123$	SBQ4T1
		SBQ4T2
		SBQ4T3
		SBQ4T4
Uy05	$\phi B4, \phi 93, \phi 115$	SBQ36T1
		SBQ36T2
Uy29	$\phi 106, \phi 107, \phi 116$	SBQ28T1
		SBQ28T2
		SBQ28T3
Uy45	$\phi St, \phi 93, \phi 94$	SBQ45T1
		SBQ45T2
		SBQ45T3

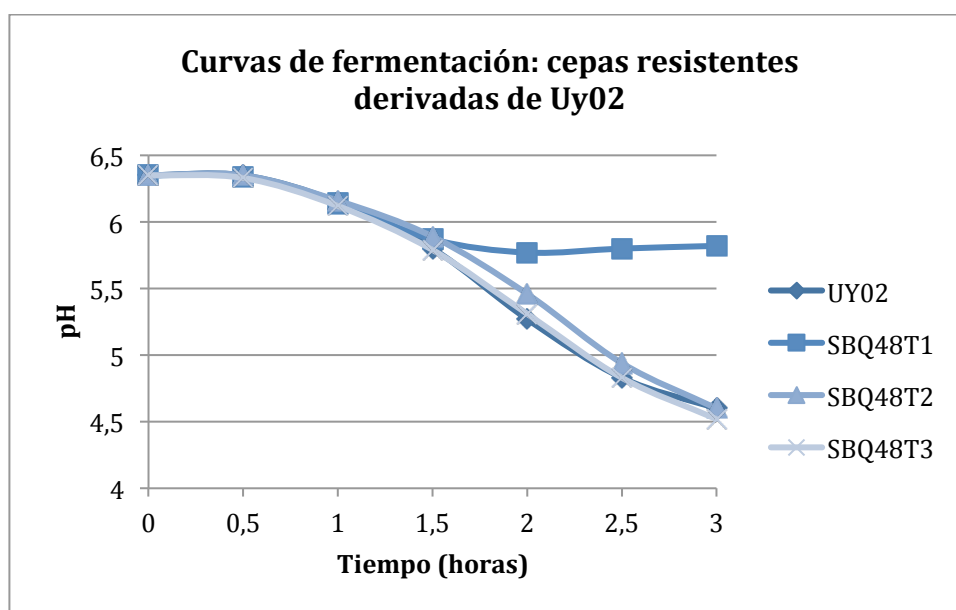


Figura 63: Curvas de fermentación para cepas resistentes derivadas de Uy02

La curva de fermentación de la cepa SBQ48T1 muestra un perfil muy diferente al de la cepa madre Uy02 marcado por un enlentecimiento y posterior estancamiento de la fermentación (Figura 63). Este resultado obligó a descartar dicha cepa. Aún así, se procedió a corroborar que esta curva no estuviera dentro del rango aceptable de fermentación, para eliminar posibles dudas (Figura 64). Las otras dos cepas muestran un perfil casi exacto al de la cepa madre, por lo que estas cepas se conservan pues cumplen con ambos criterios de selección

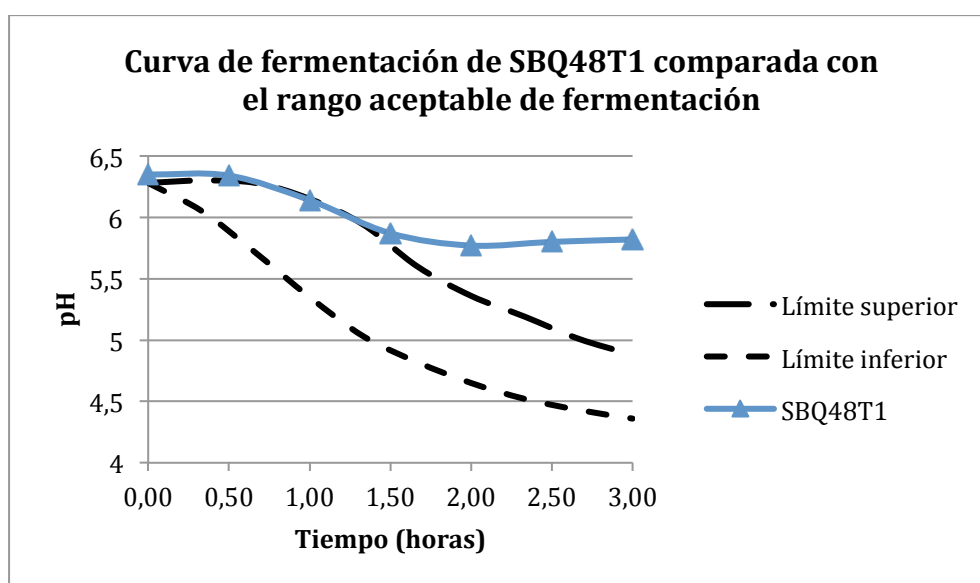


Figura 64: Curva de fermentación de SBQ48T1. Se puede observar que la curva de la cepa SBQ48T1 no se encuentra dentro del rango aceptable

Resistentes derivadas de Uy03

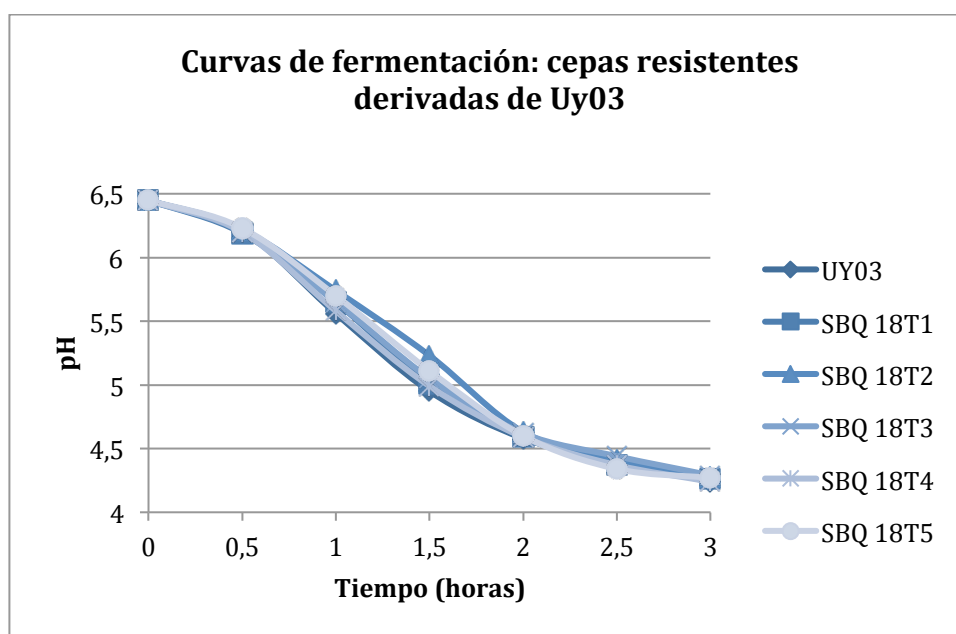


Figura 65: Curvas de fermentación para cepas resistentes derivadas de Uy03

Los resultados representados en estas curvas, muestran que las cinco cepas obtenidas se comportan de manera similar a la cepa madre Uy03 (Figura 65), por lo tanto las cinco cepas se conservan.

Resistentes derivadas de Uy04

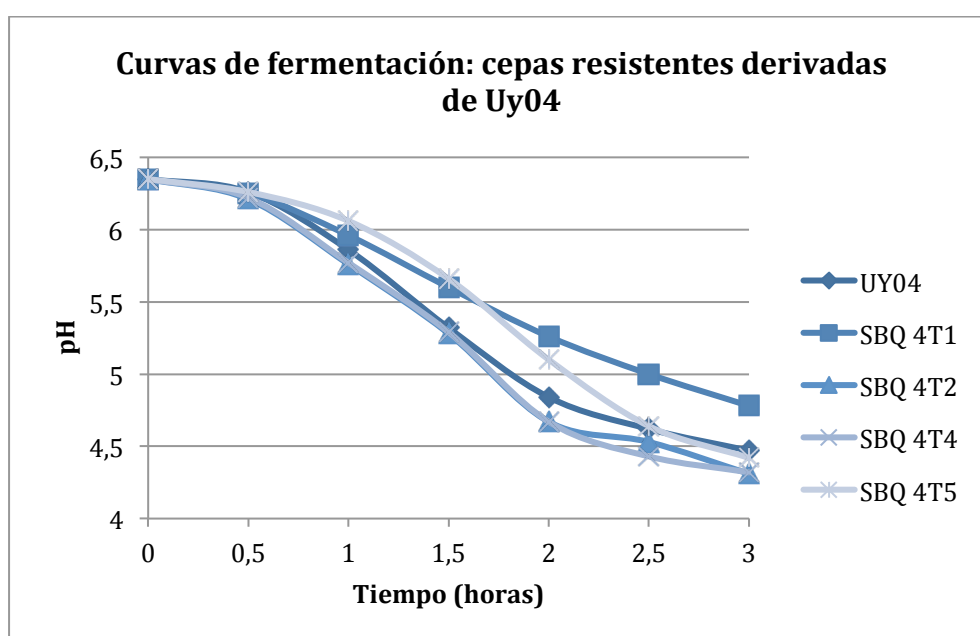


Figura 66: Curvas de fermentación para cepas resistentes derivadas de Uy04

En este caso observamos que las curvas de las cepas SBQ4T1 y SBQ4T5 son diferentes a la curva de Uy04 (Figura 66). Para decidir si conservarlas o eliminarlas se compararon ambas curvas con el rango aceptable de fermentación (Figura 67).

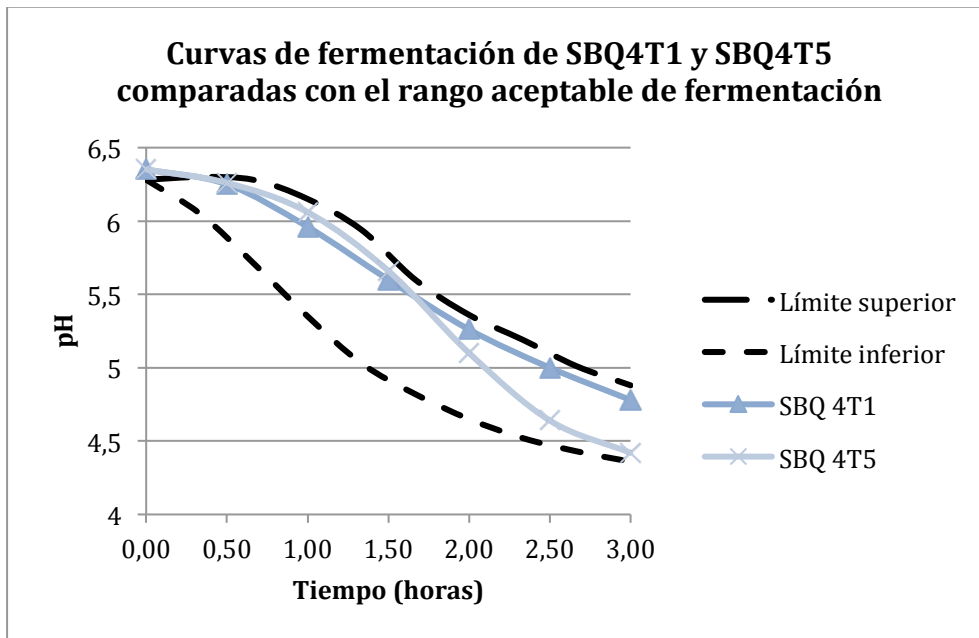


Figura 67: Curvas de fermentación de SBQ4T1 y SBQ4T5. Se puede observar que ambas curvas se encuentran dentro del rango

En este caso observamos que ambas curvas se encuentran dentro del rango aceptable de fermentación, por lo tanto ninguna de estas cepas se descartó.

Resistentes derivadas de Uy05

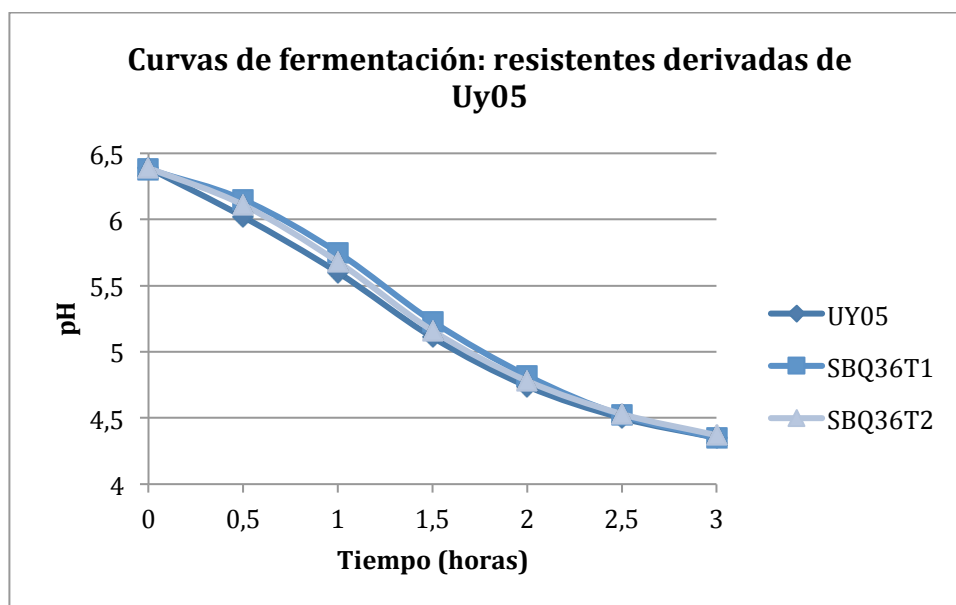


Figura 68: Curvas de fermentación para cepas resistentes derivadas de Uy05

Los resultados representados en estas curvas, muestran que las dos cepas obtenidas se comportan de manera similar a la cepa madre Uy05 (Figura 68), por lo tanto las cepas se conservan.

Resistentes derivadas de Uy29

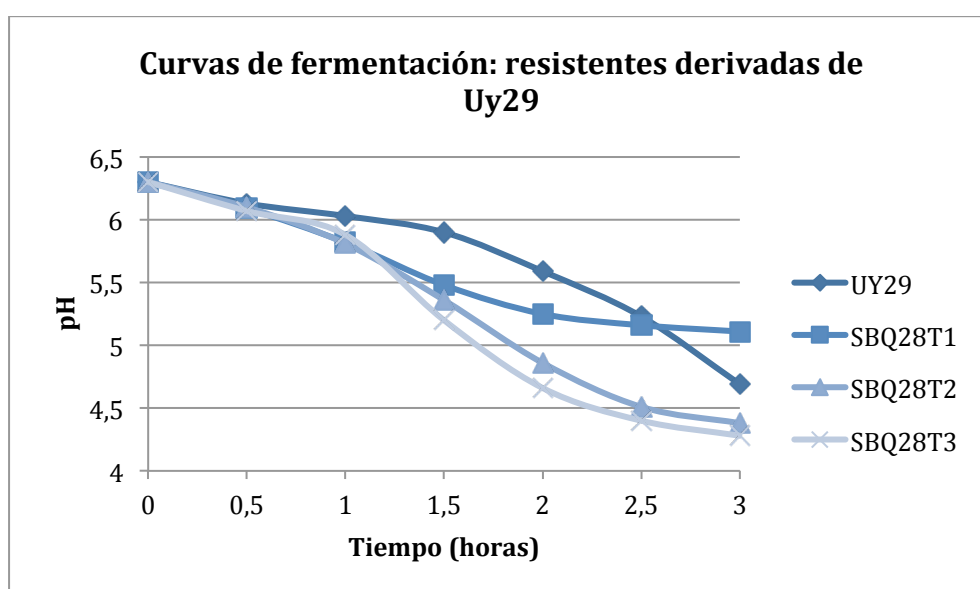


Figura 69: Curvas de fermentación para cepas resistentes derivadas de Uy029

En este caso, observamos que ninguna de las tres cepas obtenidas se comporta de forma similar a la cepa madre (Figura 69), por lo tanto se procedió a comparar las curvas con el rango aceptable de fermentación (Figura 70).

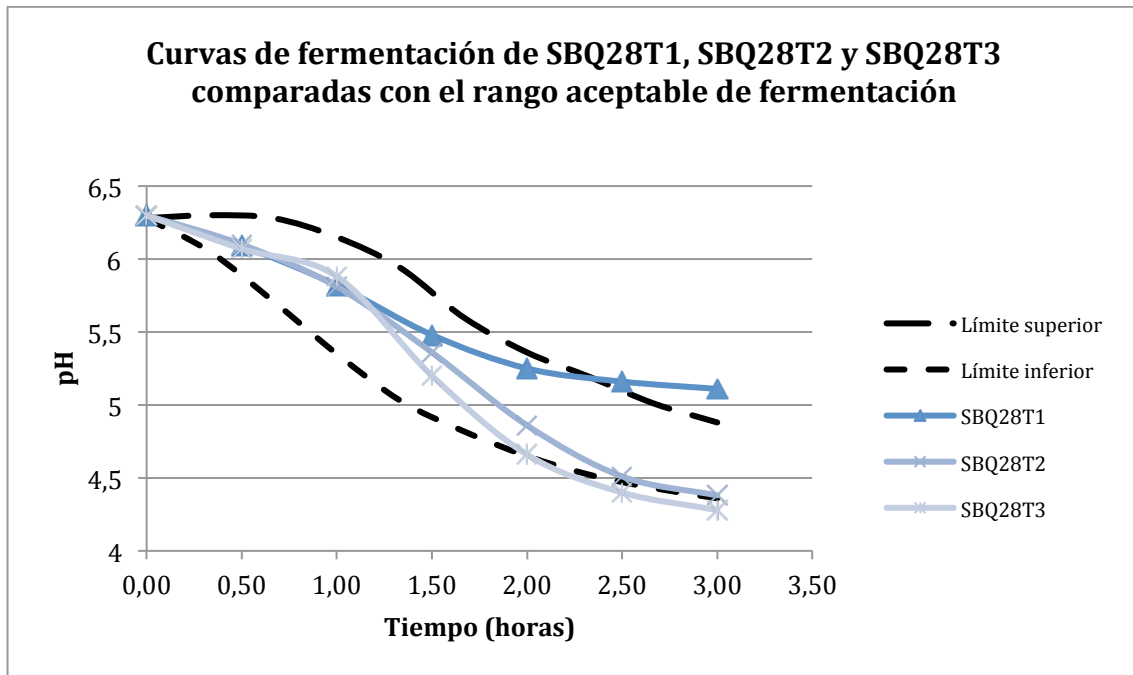


Figura 70: Curvas de fermentación de SBQ28T1, SBQ28T2 y SBQ28T3. Se puede observar que las curvas de dos de las cepas se encuentran dentro del rango

De la Figura 70 sacamos como conclusión que la cepa SBQ28T1 no se encuentra dentro del rango aceptable de fermentación, por lo tanto esta cepa fue descartada, conservando las otras dos.

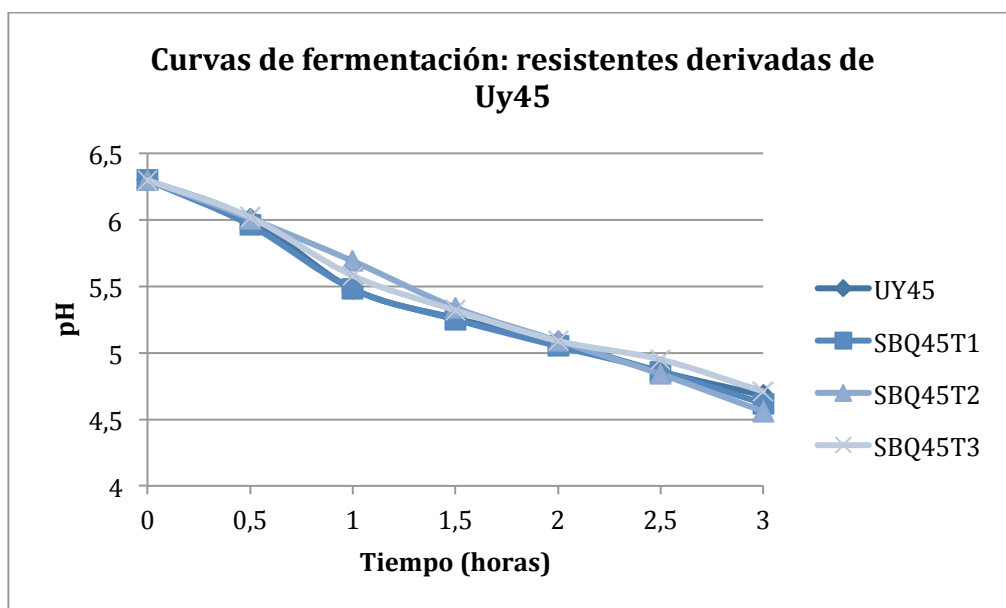


Figura 71: Curvas de fermentación para cepas resistentes derivadas de Uy045

Los resultados obtenidos muestran que las tres cepas resistentes se comportan de manera similar a la cepa madre Uy45 (Figura 71), por lo tanto estas tres cepas fueron conservadas.

Análisis del sistema CRISPR como método de evaluación de cepas resistentes

Análisis de *loci* CRISPR

El objetivo del análisis de *loci* CRISPR, fue su utilización como herramienta de estudio de la resistencia adquirida. El mecanismo de acción del sistema se detalla en la introducción. El análisis propuesto es muy simple: una vez obtenidas las cepas resistentes, se buscaron nuevos espaciadores incorporados al sistema y luego se procedió a ubicar su posición en el genoma del fago. Nuestra hipótesis es que aquellos que se encontraran en regiones menos variables del genoma se consideran mejores, por tanto aquellas cepas que poseyeran estos espaciadores se consideraron mejores cepas que aquellas que hubieran obtenido espaciadores en otras regiones. Las regiones menos variables del genoma son aquellas en donde se encuentran genes que codifican proteínas no estructurales (lisinas, endonucleasas, etc.), seguidas por las regiones que codifican proteínas estructurales (a excepción de la región que codifica el gen del receptor, la cual en nuestro análisis genómico mostro ser muy variable). Por último, los espaciadores cuyas secuencias se encuentran en regiones intergénicas o que codifican proteínas hipotéticas son las que aportan menor confianza, ya que pudimos observar que estas regiones no se encuentran conservadas entre los diferentes fagos que analizamos y por lo tanto la posibilidad de la ocurrencia de una mutación puede ser mayor. A su vez los nuevos espaciadores deben encontrarse adyacentes a un motivo PAM específico para cada tipo de sistema. Si las secuencias incorporadas no se encuentran adyacentes a un motivo PAM, el espaciador no será funcional y por tanto la cepa no será resistente.

Tres cepas fueron elegidas en un principio para trabajar sobre el análisis del sistema CRISPR. Las cepas elegidas fueron Uy02, Uy03 y Uy05, y el motivo de esta elección fue que cada una es sensible a algún fago cuyo genoma había sido previamente secuenciado y analizado. El primer paso del análisis fue la amplificación de los distintos *loci* CRISPR presentes en las cepas (Figura 72). Las cepas de *Streptococcus thermophilus* pueden poseer hasta cuatro *loci* CRISPR diferentes llamados CRISPR1 (subtipo II-A), CRISPR2 (subtipo III-A), CRISPR3, (subtipo II-A) y CRISPR4 (subtipo I-E). De estos, generalmente son activos únicamente los del subtipo II-A.

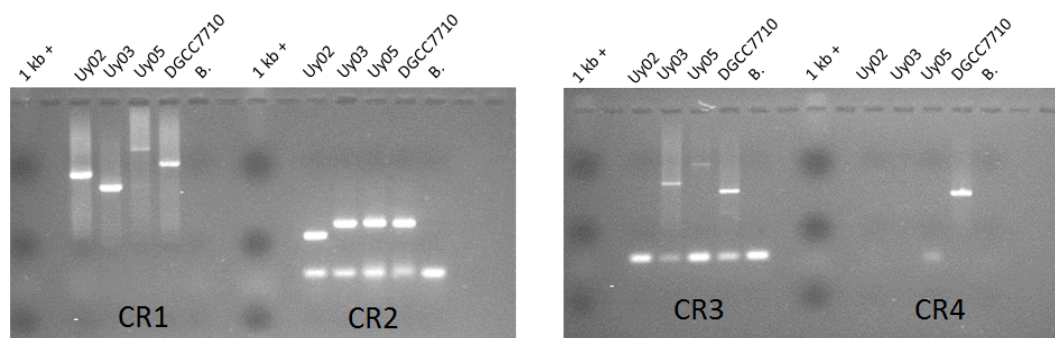


Figura 72: Amplificación de los *loci* CRISPR de las cepas Uy01, Uy02 y Uy05. La cepa DGCC7710 (Danisco-Dupont) fue utilizada como control.

Este análisis mostró varios resultados interesantes. En primer lugar ninguna de la cepas estudiadas posee *locus* CRISPR4, lo cual no es extraño, ya que no es un rasgo muy común. El segundo resultado observado fue que el *locus* CRISPR2 se encuentra en apariencia inactivo. Esto se puede concluir debido al pequeño tamaño de la secuencia lo que se relaciona directamente con la cantidad d espaciadores (esto fue comprobado posteriormente por secuenciación). Por último, un resultado sumamente interesante es la ausencia de *locus* CRISPR3 en la cepa Uy02, esto quiere decir que el único *locus* potencialmente activo de esta cepa es el *locus* CRISPR1. Esto representa una gran ventaja para el análisis de la evolución de la resistencia adquirida, ya que únicamente se debe amplificar y secuenciar un *locus* en lugar de dos (CRISPR1 y CRISPR3) luego de realizados los ensayos de generación de resistentes. Es por esto, que la cepa Uy02 fue seleccionada para los ensayos de evaluación de la resistencia adquirida. También fueron llevados a cabo algunos ensayos con las otras cepas, pero en este trabajo solo presentaremos los resultados para la cepa Uy02.

El siguiente paso fue la secuenciación de los *loci* CRISPR1 y CRISPR2 de la cepa Uy02 y el análisis de los espaciadores presentes.

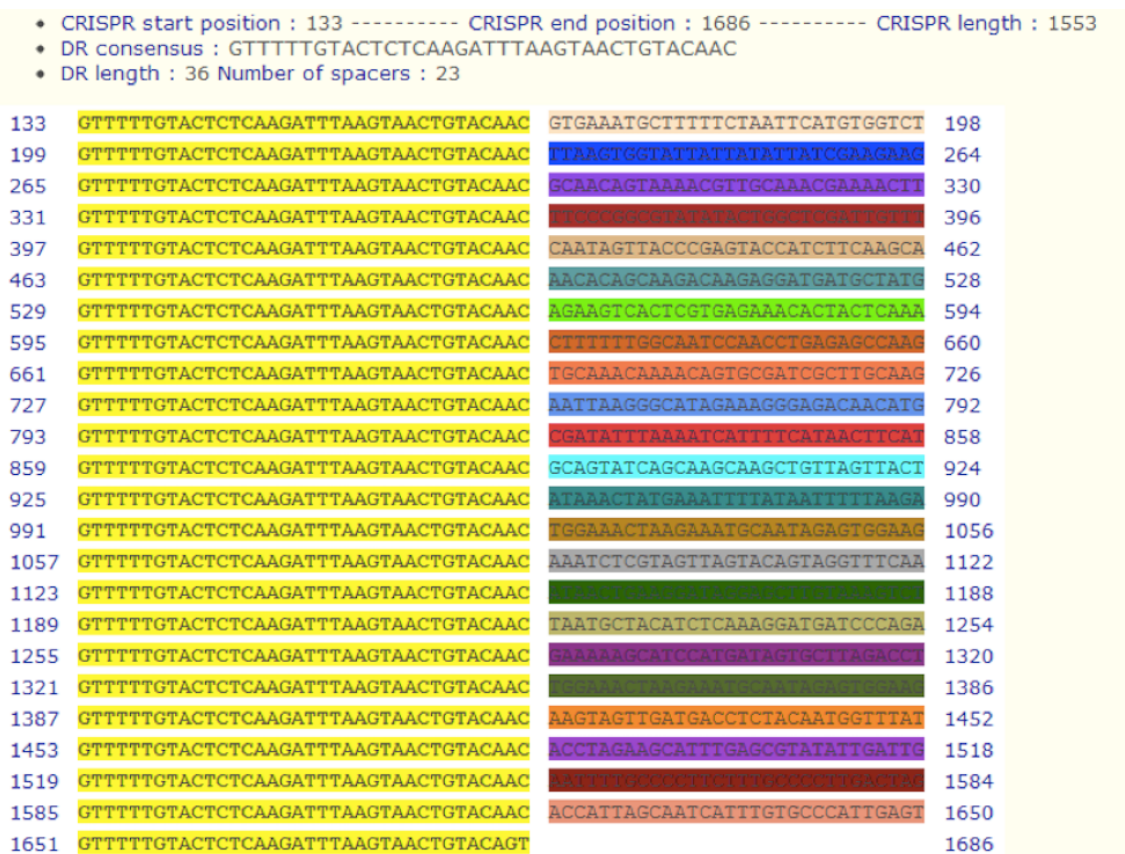


Figura 73: Espaciadores y secuencia palindrómica del *locus* CRISPR1 de Uy02. Esta captura fue obtenida usando el software CRISPRfinder (<http://crispr.u-psud.fr>).

El *locus* CRISPR1 de Uy02 posee 23 espaciadores y el largo de la secuencia palindrómica que separa los espaciadores es de 36 pares de bases (Figura 73). Las secuencias espaciadoras fueron analizadas mediante BLAST y algunos resultados se presentan en la Tabla 40. Los resultados completos del análisis pueden encontrarse en el Anexo 4.

Tabla 40: Análisis de espaciadores *locus* CRISPR1 Uy02. En blanco se marcan aquellos que no tienen ningún match con la base de datos del NCBI, en celeste aquellos que únicamente coinciden con secuencias de genomas fágicos y en azul oscuro aquellas secuencias cuyo resultado de BLAST son secuencias espaciadoras de *loci* CRISPR presentes en la base de datos.

Espaciadores	
Espaciador 1 GTGAAATGCTTTTCTAATTCATGTGGTCT	Espaciador 13 ATAAACTATGAAATTTTATAATTTTAAAGA
Espaciador 2 TTAAGTGGTATTATTATATTATCGAAGAAG	Espaciador 14 TGGAACTAAGAAATGCAATAGAGTGGAAG
Espaciador 3 GCAACAGTAAACGTTGCAAACGAAACTT	Espaciador 15 AAATCTCGTAGTTAGTACAGTAGGTTTCAA
Espaciador 4 TTCCCGGCGTATATACTGGCTCGATTGTTT	Espaciador 16 ATAACTGAAGGATAGGAGCTTGTAAGTCT
Espaciador 5 CAATAGTTACCCGAGTACCATCTTCAAGCA	Espaciador 17 TAATGCTACATCTCAAAGGATGATCCCAGA
Espaciador 6 AACACAGCAAGACAAGAGGATGATGCTATG	Espaciador 18 GAAAAAGCATCCATGATAGTGCTTAGACCT
Espaciador 7 AGAAGTCACTCGTGAGAAACACTACTCAA	Espaciador 19 TGAACTAAGAAATGCAATAGAGTGGAAG
Espaciador 8 CTTTTTTGGCAATCCAACCTGAGAGCCAAG	Espaciador 20 AAGTAGTTGATGACCTCTACAATGGTTTAT
Espaciador 9 TGCAACAAAACAGTGCGATCGCTTGCAAG	Espaciador 21 ACCTAGAAGCATTGAGCGTATATTGATTG
Espaciador 10 AATTAAGGCATAGAAAGGGAGACAACATG	Espaciador 22 AATTTTGCCCTTCTTTGCCCTTGACTAG
Espaciador 11 CGATATTTAAATCATTTTCATAACTTCAT	Espaciador 23 ACCATTAGCAATCATTTGTGCCATTGAGT
Espaciador 12 GCAGTATCAGCAAGCAAGCTGTTAGTTACT	

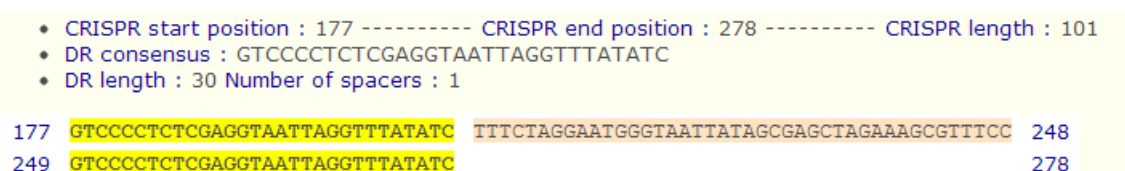


Figura 74: Espaciadores y secuencia palindrómica del *locus* CRISPR2 de Uy02. Esta captura fue obtenida usando el software CRISPRfinder (<http://crispr.u-psud.fr>).

Tabla 41: Análisis de espaciadores *locus* CRISPR2 Uy02. La referencia de color es similar a la de la Tabla 40

Espaciadores
Espaciador1 TTTCTAGGAATGGGTAATTATAGCGAGCTAGAAAGCGTTTCC

Una vez obtenidos estos resultados, el paso siguiente fue la generación de cepas resistentes. La selección fue llevada a cabo utilizando el fago $\phi 128$, mediante el método de generación en medio sólido pero sin pruebas de control (ver materiales y métodos).

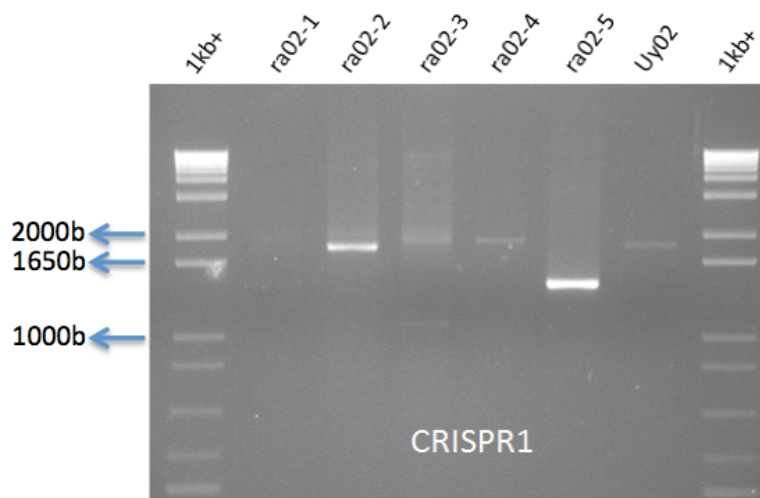


Figura 75: Amplificación del locus CRISPR1 de Uy02 y sus derivados resistentes. MM: 1kb+ Invitrogen.

En el primer ensayo de selección se obtuvieron cinco clones en la placa. De los cinco, se seleccionaron dos (ra02-4 y 5) para secuenciar, ya que fueron los que mostraron diferencias en el tamaño del *locus* con respecto al control (Figura 75). Antes de la secuenciación, el clon que más interés nos despertó fue el ra02-5, ya que la banda mostraba un tamaño menor al control y las escisiones son eventos poco frecuentes.

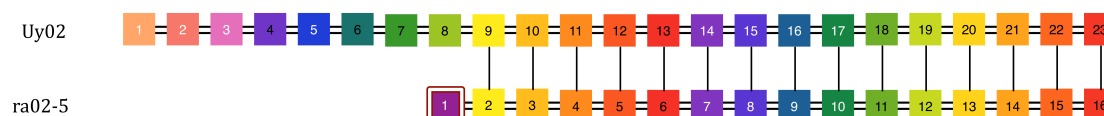


Figura 76: Comparación de espaciadores en el locus CRISPR. Los cuadrados de igual color y unidos por una línea vertical representan espaciadores con la misma secuencia. Los nuevos espaciadores están marcados con borde doble.

El *locus* de la cepa ra02-5 posee solamente 16 espaciadores. Luego del análisis, observamos que los ocho primeros espaciadores se habían perdido y un nuevo espaciador había sido incorporado en la primer posición. La secuencia del espaciador fue ubicada en el genoma del fago $\phi 128$. La secuencia de 30 pares de bases se encuentra en la posición 8501 (hebra líder) dentro del ORF 12, el cual codifica una proteína componente de la cola del bacteriófago.

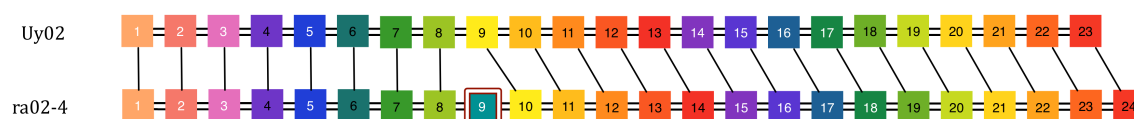


Figura 77: Comparación de espaciadores en el locus CRISPR. Los cuadrados de igual color y unidos por una línea vertical representan espaciadores con la misma secuencia. Los nuevos espaciadores están marcados con borde doble.

El *locus* de la cepa ra02-4 presenta 24 espaciadores, uno más que la cepa madre Uy02. Lo realmente interesante, es que el nuevo espaciador no fue incorporado en la primera posición al extremo 5' como es lo normal, sino que el nuevo espaciador se incorporó en la posición 9, sin que haya habido pérdida de espaciadores. Este resultado por demás extraño, podría haber sido una excepción, es por eso que se decidió generar más resistentes y estudiar si la incorporación de espaciadores se daba en la primera posición según era lo esperado o por el contrario la incorporación en lugares al azar era común para esta cepa. La secuencia del espaciador fue ubicada en el genoma del fago, encontrándose en la posición 10965 (hebra líder) dentro del ORF 13, el cual codifica una proteína componente de la cola del bacteriófago.

En esta segunda instancia, se obtuvieron 21 clones diferentes, los cuales fueron analizados en su totalidad. De estos 21, 11 mostraron un resultado esperable en lo referente a la adquisición de espaciadores, incorporando los nuevos en la primera posición en el extremo 5' del *locus*. Los otros 10, mostraron resultados variables, incorporándose los espaciadores al azar en el *locus*, produciéndose deleciones en algunos casos. Un resultado particularmente extraño se observó en dos clones. Estos clones mostraban duplicación de espaciadores en el extremo 5', y entre las duplicaciones se insertó un nuevo espaciador. En el caso de ra02-9 (Figura 78) se duplicaron los dos primeros espaciadores. El análisis detallado de los espaciadores de estos clones se encuentra en la Tabla 42.

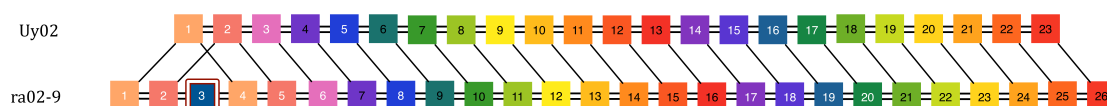


Figura 78: Comparación de espaciadores en el locus CRISPR. Los cuadrados de igual color y unidos por una línea representan espaciadores con la misma secuencia. Los nuevos espaciadores están marcados con borde doble.

Por último, se ubicaron las posiciones de todos los espaciadores obtenidos en el genoma del fago. Para que los nuevos espaciadores sean funcionales deben cumplir con dos características. En primer lugar, la secuencia del espaciador debe ser exactamente igual a la secuencia protoespaciadora (llamamos secuencia protoespaciadora a la secuencia del espaciador ubicada en el genoma del fago) y la secuencia protoespaciadora debe tener un motivo PAM adyacente en el extremo 3'. El motivo PAM reconocido por el sistema CRISPR1 es NNAGAA(A/T). Esto limita los sitios de los cuales pueden adquirirse nuevos espaciadores. Para el caso del genoma del fago ϕ 128 existen 261 motivos PAM-CRISPR1 presentes, 165 en la hebra líder y 96 en la hebra complementaria.

Todas las secuencias protoespaciadoras presentaron un motivo PAM adyacente y ninguna se encuentra en una región intergénica o proteína hipotética, lo que las hace a todas las cepas buenos prospectos. La ubicación de estas secuencias puede observarse de manera gráfica en la Figura 79.

Tabla 42: análisis de espaciadores

Cepa	Secuencia	Posición CRISPR	Deleciones	Duplicaciones	Posición genoma fago	Hebra	PAM	Similar
ra02-4	TAAATGGCTTGGCAAGACATGGGATGGCAT	9			10964	Líder	GAAGAAA	ra02-27
ra02-5	CTTGAAATGCAACTGGTGAACTGACCCA	1	Primeros 9 espaciadores		8500	Líder	AAAGAAT	
ra02-6	TTACCAATAAAAAACGTAGCAGATTTTCAT	23			20167	Líder	AAAGAAT	
ra02-7	ATTTACCTACAGATAAATCTGAATCGTCT	10			23670	Líder	GTAGAAA	
ra02-8	AAATTAATGAGCAGGTAGTCAATACATTCA	1			26542	Líder	AAAGAAA	ra02-11
ra02-9	TTTTCTATCGCATCTTTGCTAAAAAAGAAG	3		Primeros dos espaciadores	27871	Líder	ACAGAAA	
ra02-10	TTAACGCTCCGATTTTCATCCATTTTTTCG	10			11440	Comp	ATAGAAA	
ra02-11	AAATTAATGAGCAGGTAGTCAATACATTCA	1			26542	Líder	AAAGAAA	ra02-8
ra02-12	ACCAAGAAGCAGATAAAAACCATCACGGCA	1			15665	Líder	TTAGAAA	
ra02-13	TTAGATCTCATGAGTGGCGACAGTGAGCTT	23			29547	Líder	GTAGAAT	
ra02-15	TGGAATTATCAAAAGCTGGCTATATGGTAT	1			30934	Líder	TTAGAAT	
ra02-16	TATCACCCAACCTTTCTTGCTTTCTAAGTG	9			6647	Comp	TCAGAAA	ra02-19
ra02-17	TACCATCTTGGGATAGGTACTGGTCATGCC	1			4186	Comp	ATAGAAA	ra02-28
ra02-18	ATAGAGCGACTCAAAAAATTGAAAGCATCT	3			25410	Líder	GAAGAAA	
ra02-19	ATCACCCAACCTTTCTTGCTTTCTAAGTG	1	Primer espaciador		6647	Comp	TCAGAAA	ra02-16
ra02-20	TTGGATTCGATTGATTGGGAAGATGATTC	1			25308	Líder	TCAGAAA	
ra02-21	CCAGCATAGCGCTTGATAGTGATTTGATA	1			5360	Comp	AGAGAAA	
ra02-22	AGAAGCACCTATTGCGTTGATAAAAGTATT	1			28630	Líder	GCAGAAA	
ra02-23	CAGTATTTTTTCCATTGTAGCTGTAATGGA	16			19834	Comp	ATAGAAA	
ra02-25	ATATTCATATTCCTGCTCATGTTTGATAG	9			29316	Comp	CAAGAAT	
ra02-27	TAAATGGCTTGGCAAGACATGGGATGGCAT	2		Primer espaciador	10964	Líder	GAAGAAA	ra02-4
ra02-28	TACCATCTTGGGATAGGTACTGGTCATGCC	1			4186	Comp	ATAGAAA	ra02-17
ra02-29	AGGGTCAGCAACCCAGTTACCAATCTGTTG	1			10248	Comp	TAAGAAT	

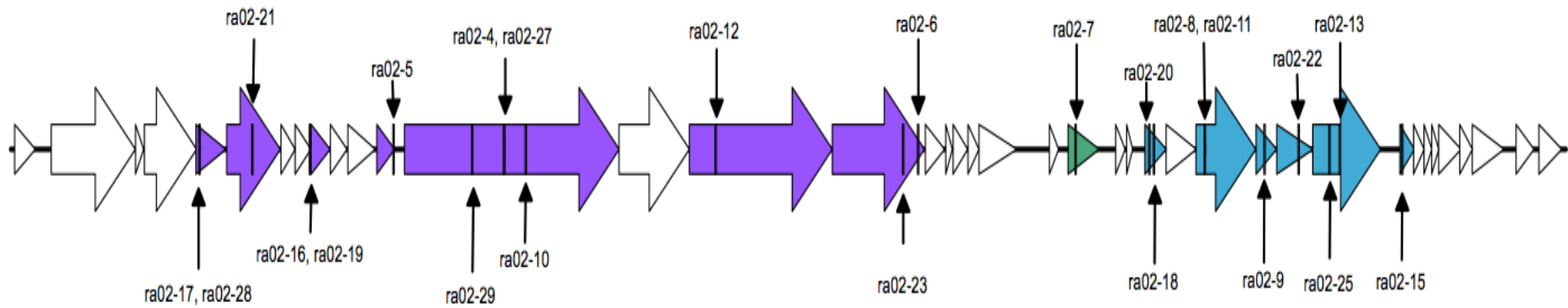


Figura 79: Representación gráfica de la posición de las secuencias espaciadoras en el genoma del fago ϕ 128. En violeta se representan las proteínas estructurales, en verde una proteasa ubicada en la región del módulo de lisis y en azul proteínas del módulo de procesamiento de ADN. Ninguno de los espaciadores se encuentra en una región intergénica o proteína hipotética.

Estudio multigeneracional de la evolución del *locus* CRISPR1

Para estudiar como evoluciona la composición de espaciadores frente a ataques sucesivos de fagos, se realizó un ensayo de análisis multigeneracional utilizando la cepa Uy02 y el fago $\phi 128$. Se eligió esta cepa ya que al carecer de *locus* CRISPR3, todos los nuevos espaciadores serían incorporados al *locus* CRISPR1, lo cual facilitó el análisis posterior de resultados.

El ensayo consistió en realizar ensayos de infección y recuperando clones bacterianos en placa luego de transcurrida la infección en generaciones sucesivas utilizando el fago $\phi 128$ y analizando la composición del *locus* CRISPR1 de las nuevas cepas obtenidas. La Figura 80 representa de forma esquemática el proceso de generación de los resistentes.

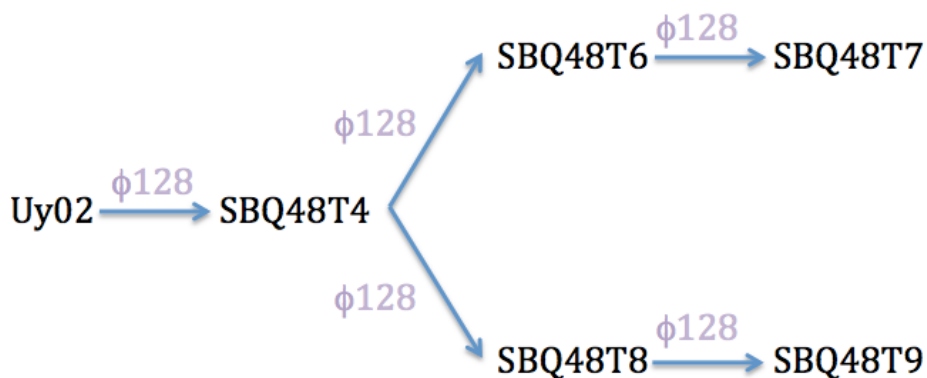


Figura 80: Esquema de obtención de cepas mutantes CRISPR1 derivadas de Uy02 utilizando el fago $\phi 128$

Evolución de Uy02 a SBQ48T7

Después del primer desafío se obtuvo la cepa resistente SBQ48T4. El análisis del *locus* CRISPR1 de SBQ48T4 mostró una delección de los primeros seis espaciadores y la adición de uno nuevo en la primera posición del *locus* y otro en la cuarta posición, entre los espaciadores ocho y nueve del *locus* de la cepa madre Uy02. La secuencia protoespaciadora correspondiente al espaciador en la posición uno, se encuentra en la posición 29316 del genoma en la hebra complementaria, y coincide con el espaciador adquirido por la cepa ra02-25. La secuencia del espaciador en la posición cuatro se encuentra en la posición 33062 del genoma en la hebra líder. Ambas secuencias poseen un motivo PAM adyacente en la región 3', por lo tanto ambos son funcionales. La adquisición de dos espaciadores en un solo evento de selección es un fenómeno poco común, por lo que esta cepa es particularmente especial.

En el segundo ensayo se incubó la cepa SBQ48T4 con una alícuota del fago, se realizó un aislamiento en placa y se recuperó un clon llamado SBQ48T6. El análisis del *locus* CRISPR1 de SBQ48T6 mostró que era similar al de SBQ48T4, con la diferencia que el espaciador adquirido en la cuarta posición se había perdido sin ningún motivo aparente.

El último ensayo consistió en la co-incubación de SBQ48T6 con el fago $\phi 128$ y se obtuvo el clon SBQ48T7. El análisis del *locus* CRISPR1 de esta cepa mostró que un nuevo espaciador fue incorporado en la penúltima posición del *locus*. La secuencia de este nuevo espaciador es la misma que la de los espaciadores en la posición 9 de ra02-4 y en la posición dos de ra02-27.

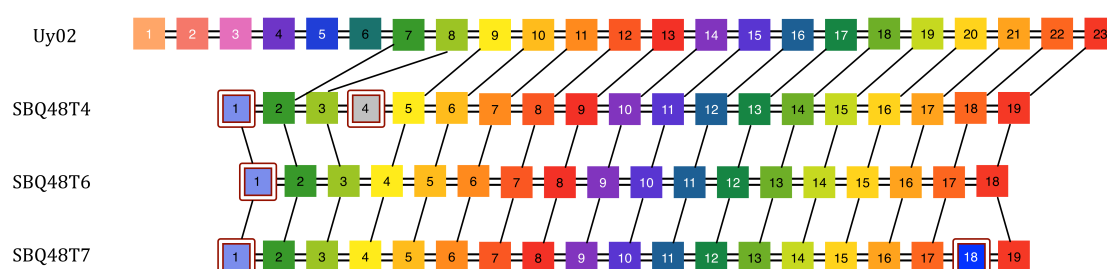


Figura 81: Comparación del locus CRISPR1 de las diferentes cepas obtenidas durante las etapas sucesivas de selección.

Evolución de Uy02 a SBQ48T9

El primer paso del ensayo es común al ensayo anterior. Del segundo ensayo que consistió en el desafío entre SBQ48T4 y $\phi 128$ se obtuvo el clon SBQ48T8. El análisis del *locus* CRISPR1, mostró que el espaciador en la posición cuatro sufrió dos mutaciones, lo que lo hizo perder su funcionalidad (Figura 83).

El último paso del ensayo que consistió en el desafío entre SBQ48T8 y $\phi 128$, dio como resultado el clon SBQ48T9. El estudio del *locus* CRISPR1 de esta cepa mostró que el espaciador mutado no funcional de SBQ48T4 se perdió. A su vez se observa que ocurrió una nueva incorporación en la penúltima posición. La secuencia del protoespaciador se encuentra en la posición 29064 del genoma del fago en la hebra líder.

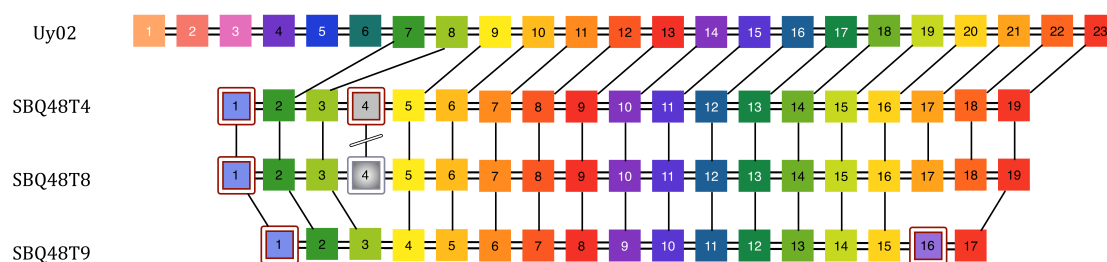


Figura 82: Comparación del locus CRISPR1 de las diferentes cepas obtenidas durante las etapas sucesivas de selección.

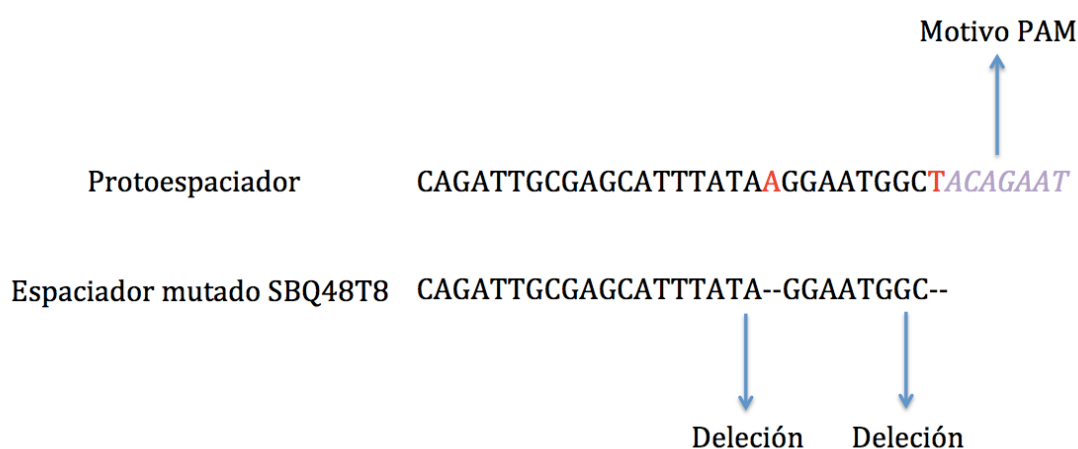


Figura 83: Mutaciones sufridas por el espaciador en la posición cuatro de la cepa SBQ48T8

Los resultados obtenidos de estos ensayos demostraron que la generación de resistentes en generaciones consecutivas puede ayudar a mejorar la calidad de la resistencia mediante la obtención de nuevos espaciadores. También hemos podido observar que el modelo establecido para la adquisición de nuevos espaciadores no se cumple para esta cepa. Tradicionalmente se acepta que los nuevos espaciadores se incorporan en el extremo 5' del *locus* adyacente a la secuencia líder. Nosotros hemos podido observar que este no es el caso para esta cepa, ya que si bien muchas de las cepas obtenidas incorporaron espaciadores en la primera posición, casi el mismo número de cepas los adquirieron en posiciones diferentes. Esto abre una nueva interrogante acerca de cómo ocurre la incorporación de espaciadores en el sistema CRISPR. También pudimos observar que los nuevos espaciadores adquiridos no siempre son estables y pueden perderse. Este es el caso que observamos para el espaciador en la cuarta posición en SBQ48T4. En ambos ensayos de evolución, dicho espaciador se perdió sin explicación aparente, en un caso directamente desapareció en la siguiente generación de resistentes y en el otro caso, sufrió mutaciones para luego ser eliminado. El motivo de esta

inestabilidad nos es desconocido, lo que nos lleva a concluir que se abre un nuevo problema a la hora de realizar selección de resistentes: una nueva cepa por más que haya obtenido un espaciador no necesariamente será resistente en el tiempo, es necesario realizar varios ensayos de infección para comprobar la estabilidad de la resistencia y poder estar seguros de que puede utilizarse con confianza como cultivo iniciador.

Conclusiones y perspectivas

En este trabajo el objetivo principal fue la obtención de cepas de *Streptococcus thermophilus* resistentes a los bacteriófagos presentes en plantas queseras de Uruguay con el potencial de ser utilizadas como iniciadores a nivel industrial.

Para alcanzar este objetivo, en primer lugar se debió optimizar la metodología para detectar la presencia de los fagos en la planta. Para ello se optimizaron técnicas de detección rápidas y eficaces que permitieron identificar cuáles de los problemas en la planta estaban asociados a bacteriófagos. Gracias a estas técnicas ajustadas y a un intenso muestreo realizado durante tres años, se comprobó que los ataques fágicos son una problemática muy importante a nivel de producción que necesita ser abordada para encontrar soluciones que ayuden a mejorar la eficiencia en la producción quesera en nuestro país.

A partir de este trabajo se creó el primer banco de fagos de *Streptococcus thermophilus* de Uruguay. Esta colección es un insumo esencial para conocer la diversidad de fagos de *S. thermophilus* presente en nuestro país y para la obtención de cepas resistentes. Esta colección se formó a partir de 115 aislamientos resultantes del análisis de 432 muestras que luego de ensayos de caracterización se redujo a 15 fagos diferentes. De estos 15 fagos, seis fueron analizados en profundidad mediante secuenciación completa de su genoma. La caracterización completa de estos fagos permitió estudiar las relaciones entre ellos y compararlos con fagos aislados en la región y el mundo.

Utilizando la colección de cepas comerciales de *Streptococcus thermophilus* aportadas por la empresa BIOMÁS y de la colección de fagos, pudimos llevar a cabo la selección y obtención de resistentes. En una primera instancia determinamos los perfiles de sensibilidad/resistencia para todas las cepas, respecto a nuestros fagos. Luego generamos por selección natural nuestras cepas resistentes, obteniendo un total de 20 nuevas cepas.

A partir del reciente abordaje sobre el mecanismo de inmunidad bacteriano CRISPR, decidimos comenzar a trabajar en la selección de resistentes basados en este enfoque. Realizamos análisis comparativos entre las secuencias CRISPR de las cepas madres y sus derivados resistentes. A partir de las secuencias de los genomas completos de fagos que pudimos realizar gracias a la cooperación con el Dr. Moineau, en la Universidad Laval en Canadá, fuimos capaces por primera vez de evaluar la resistencia adquirida a nivel molecular. Esto ha significado un avance substancial, ya que esta metodología brinda nuevas herramientas a la hora de tomar la decisión de cual, de los derivados resistentes, tendría las mejores oportunidades de mantener la resistencia adquirida a lo largo del tiempo en el ambiente industrial. De estos ensayos obtuvimos 28 nuevos derivados resistentes.

Finalmente, los resultados obtenidos del análisis del sistema CRISPR de la cepa Uy02 mostraron que el paradigma aceptado acerca del funcionamiento de este sistema no siempre se cumple, ya que pudimos observar inserción de nuevos espaciadores en posiciones aleatorias dentro del *locus*, grandes deleciones y mutación y pérdida de espaciadores adquiridos de forma reciente.

Como perspectivas, tenemos por delante la caracterización completa del resto de fagos del banco y la caracterización del sistema CRISPR de las restantes cepas de *Streptococcus thermophilus* de nuestra colección, de forma de tener los insumos necesarios para seguir generando nuevas cepas resistentes a todos los fagos aislados y continuar evaluando la resistencia adquirida.

También resta por delante el análisis de algunas muestras que por razones de tiempo no fueron seleccionadas para aislamiento, las cuales podrían contener bacteriófagos diferentes a los caracterizados en este trabajo.

Por último, nos queda pendiente el llevar a cabo pruebas a nivel industrial con las nuevas cepas, para verificar su comportamiento a la hora del escalado y funcionamiento en planta, para determinar si estas cepas pueden ser utilizadas como cultivos iniciadores.

Los resultados de esta tesis darán lugar a dos publicaciones en revistas científicas. Este es, de acuerdo a nuestro conocimiento, el primer trabajo en nuestro país sobre fagos de bacterias lácticas, lo que implica un primer paso hacia el esclarecimiento de una problemática de importancia en el sector productivo lácteo y además en la formación de recursos humanos en esta área.

- Deveau, Hélène, Barrangou, Rodolphe, Garneau, Josiane E, Labonté, Jessica, Fremaux, Christophe, Boyaval, Patrick, . . . Moineau, Sylvain. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 190(4), 1390-1400.
- Fernandez-Espla, María Dolores, Garault, Peggy, Monnet, Véronique, & Rul, Françoise. (2000). *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Applied and environmental microbiology*, 66(11), 4772-4778.
- Fox, P. F. (1993). Cheese: An Overview. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (pp. 1-36): Springer US.
- Gunnewijk, Marga GW, & Poolman, Bert. (2000). HPr (His~ P)-mediated phosphorylation differently affects counterflow and proton motive force-driven uptake via the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34080-34085.
- Haft, Daniel H, Selengut, Jeremy, Mongodin, Emmanuel F, & Nelson, Karen E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS computational biology*, 1(6), e60.
- Hale, Caryn R, Majumdar, Sonali, Elmore, Joshua, Pfister, Neil, Compton, Mark, Olson, Sara, . . . Terns, Rebecca M. (2012). Essential features and rational design of CRISPR RNAs that function with the Cas RAMP module complex to cleave RNAs. *Molecular cell*, 45(3), 292-302.
- Hatfull, Graham. (2010). Bacteriophages: Genes and Genomes. *iBioSeminars*: iBiology.org.
- Hendrix, Roger W. (2003). Bacteriophage genomics. *Current opinion in microbiology*, 6(5), 506-511.
- Hernández Magadán, Alfonso. (2007). Aislamiento, caracterización y detección precoz de bacteriófagos de *Streptococcus thermophilus* en la industria láctea.
- Hols, Pascal, Hancy, Frédéric, Fontaine, Laetitia, Grossiord, Benoît, Prozzi, Deborah, Leblond - Bourget, Nathalie, . . . Dusko Ehrlich, S. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS microbiology reviews*, 29(3), 435-463.
- Jansen, Ruud, Embden, Jan, Gaastra, Wim, & Schouls, Leo. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565-1575.
- Jinek, Martin, Chylinski, Krzysztof, Fonfara, Ines, Hauer, Michael, Doudna, Jennifer A, & Charpentier, Emmanuelle. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- Kunin, Victor, Sorek, Rotem, & Hugenholtz, Philip. (2007). Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol*, 8(4), R61.
- Kunji, Edmund RS, Mierau, Igor, Hagting, Anja, Poolman, Bert, & Konings, Wil N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 187-221.

- Lahtinen, Sampo, Ouwehand, Arthur C, Salminen, Seppo, & von Wright, Atte. (2011). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*: CRC Press.
- Lwoff, André, Horne, Robert, & Tournier, Paul. (1962). *A system of viruses*. Paper presented at the Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology.
- Madigan, Michael T, Martinko, John M, & Parker, Jack. (2004). *Brock biología de los microorganismos*.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., . . . Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15611-15616. doi: 10.1073/pnas.0607117103
- Makarova, Kira S, Aravind, L, Wolf, Yuri I, & Koonin, Eugene V. (2011). Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol Direct*, 6(1), 38.
- Makarova, Kira S, Haft, Daniel H, Barrangou, Rodolphe, Brouns, Stan JJ, Charpentier, Emmanuelle, Horvath, Philippe, . . . Yakunin, Alexander F. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467-477.
- Makarova, Kira S., & Koonin, Eugene V. (2007). Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 189(4), 1199-1208. doi: 10.1128/jb.01351-06
- Marraffini, Luciano A, & Sontheimer, Erik J. (2009). Invasive DNA, chopped and in the CRISPR. *Structure*, 17(6), 786-788.
- Mc Grath, Stephen, & van Sinderen, Douwe. (2007). *Bacteriophage: genetics and molecular biology*: Horizon Scientific Press.
- Mitchell, Timothy J. (2003). The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nature Reviews Microbiology*, 1(3), 219-230.
- Neve, H, & Tauber, M. (1991). Basic microbiology and molecular biology of bacteriophage of lactic acid bacteria in dairies. *Bulletin of the IDF*(263), 3-15.
- O'Sullivan, Orla, O'Callaghan, John, Sangrador-Vegas, Amaia, McAuliffe, Olivia, Slattey, Lydia, Kaleta, Pawel, . . . Beresford, Tom. (2009). Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiology*, 9(1), 50.
- Ott, Andreas, Germond, Jacques-Edouard, & Chaintreau, Alain. (2000). Origin of acetaldehyde during milk fermentation using ¹³C-labeled precursors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(5), 1512-1517.
- Pourcel, C, Salvignol, G, & Vergnaud, Gilles. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151(3), 653-663.
- Quiberoni, A, Moineau, S, Rousseau, G, Reinheimer, J, & Ackermann, H. (2010). *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *International Dairy Journal*, 20(10), 657-664.
- Quiberoni, A, Tremblay, D, Ackermann, H-W, Moineau, S, & Reinheimer, JA. (2006). Diversity of *Streptococcus thermophilus* Phages in a Large-Production Cheese Factory in Argentina. *Journal of dairy science*, 89(10), 3791-3799.
- Reinheimer, Jorge , & Zalazar, C. (2010). *Avances en microbiología, bioquímica y tecnología de quesos*. Santa Fe, Argentina: Ediciones UNL.

- Siezen, Roland J, & Bachmann, Herwig. (2008). Genomics of dairy fermentations. *Microbial biotechnology*, 1(6), 435-442.
- Siezen, Roland J, Bayjanov, Jumamurat, Renckens, Bernadet, Wels, Michiel, van Hijum, Sacha AFT, Molenaar, Douwe, & van Hylckama Vlieg, Johan ET. (2010). Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, a plant-associated lactic acid bacterium. *Journal of Bacteriology*, 192(10), 2649-2650.
- Slos, P, Bourquin, JC, Lemoine, Y, & Mercenier, A. (1991). Isolation and characterization of chromosomal promoters of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *Applied and environmental microbiology*, 57(5), 1333-1339.
- Sorek, Rotem, Lawrence, C Martin, & Wiedenheft, Blake. (2013). CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annual review of biochemistry*, 82, 237-266.
- Vaillancourt, Katy, Moineau, Sylvain, Frenette, Michel, Lessard, Christian, & Vadeboncoeur, Christian. (2002). Galactose and lactose genes from the galactose-positive bacterium *Streptococcus salivarius* and the phylogenetically related galactose-negative bacterium *Streptococcus thermophilus*: organization, sequence, transcription, and activity of the gal gene products. *Journal of Bacteriology*, 184(3), 785-793.
- van den Bogaard, Patrick TC, Hols, Pascal, Kuipers, Oscar P, Kleerebezem, Michiel, & de Vos, Willem M. (2004). Sugar Utilisation and Conservation of the *gal-lac* Gene Cluster in *Streptococcus thermophilus*. *Systematic and applied microbiology*, 27(1), 10-17.
- Vaughan, Elaine E, van den Bogaard, Patrick TC, Catzeddu, Pasquale, Kuipers, Oscar P, & de Vos, Willem M. (2001). Activation of Silent gal Genes in the lac-gal Regulon of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1184-1194.
- Vinderola, CG, Mocchiutti, P, & Reinheimer, JA. (2002). Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of dairy science*, 85(4), 721-729.
- Westra, Edze R, van Erp, Paul BG, Künne, Tim, Wong, Shi Pey, Staals, Raymond HJ, Seegers, Christel LC, . . . Severinov, Konstantin. (2012). CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3. *Molecular cell*, 46(5), 595-605.
- Yosef, Ido, Goren, Moran G, & Qimron, Udi. (2012). Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 40(12), 5569-5576.
- Zinno, Paola. (2008). *Diversity of Lactic Acid Bacteria Bacteriophages from Dairy Environment*. Università degli Studi di Napoli" Federico II".

Nombre de la cepa

Uy01

Uy02

Uy03

Uy04

Uy05

Uy06

Uy07

Uy08

Uy09

Uy10

Uy11

Uy12

Uy13

Uy14

Uy15

Uy16

Uy17

Uy18

Uy19

Uy20

Uy21

Uy22

Uy23

Uy24

Uy25

Uy26

Uy27

Uy28

Uy29

Uy30

Uy31

Uy32

Uy33

Uy34

Uy35

Uy36

Uy37

Uy38

Uy39

Uy40

Uy41

Uy42

Uy43

Uy44

Uy45

Uy46

Uy47

Uy48

Uy49

Uy50

Uy51

Cepas de *Streptococcus thermophilus* utiliza

Seleccionada para ensayos de rango de fermentación

x

x

x

x

x

x

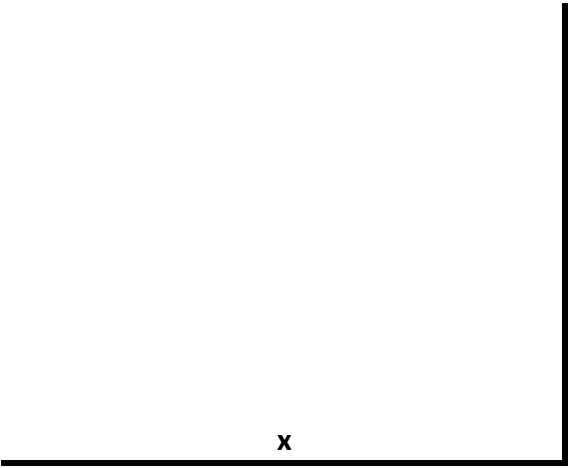
x

x

x
x

das

Descartadas por presencia de profagos



Muestras de suero con información incompleta	
Total de muestras de suero	Muestras de suero con información incompleta
258	221

Muestras de suero con información completa	
Total de muestras de suero	Muestras de suero con información completa
258	37

Potes de fermento		
Potes de fermento analizados	Positivos para fagos	Porcentaje de positivos
10	3	33%

Muestras de leche		
Muestras de leche analizadas	Positivos para fagos	Porcentaje de positivos
102	18	18%

completa	
Positivos para fagos	Porcentaje de positivos
122	55%

completa	
Positivos para fagos	Porcentaje de positivos
29	78%

;

;

Nombre	Fecha del aislamiento	Número de muestra
P1	8/24/2010	1
P2	8/24/2010	1
P3	8/24/2010	1
P4	8/24/2010	1
P5	8/24/2010	1
P6	8/24/2010	1
P7	8/24/2010	1
P8	8/24/2010	1
P10	9/16/2010	1
P11	9/16/2010	1
P12	9/16/2010	1
P13	9/16/2010	1
P14	9/16/2010	1
P15	9/16/2010	1
P16	9/16/2010	1
P17	9/16/2010	1
P18	9/16/2010	1
P19	9/16/2010	1
P20	9/16/2010	1
P21	9/16/2010	1
P22	9/16/2010	1
P23	9/16/2010	1
P24	9/16/2010	1
P25	9/16/2010	1
P26	9/16/2010	1
P27	9/16/2010	1
P28	9/16/2010	1
P9	9/16/2010	1
P39	10/15/2010	1
P41	10/18/2010	4
P42	10/18/2010	4
P43	10/18/2010	4
P44	10/18/2010	4
P45	10/18/2010	4
P46	10/18/2010	4
P47	10/18/2010	4
P48	10/18/2010	4
P49	10/18/2010	4
P50	sin aislar	1
P53	10/19/2010	1
P52	10/19/2010	4
p54	10/27/2010	2
p56	10/27/2010	2
p57	10/27/2010	2
p58	10/27/2010	2
p59	10/27/2010	2
p60	10/27/2010	2
p61	10/27/2010	2
p62	10/27/2010	2
p63	10/27/2010	2
ProfHA	40525	presunto profago en la
p64	12/15/2010	1
p65	12/15/2010	1
p66	12/15/2010	1

p67	12/15/2010	1
p68	12/15/2010	1
p69	12/15/2010	1
P72	2/9/2011	4
P73	2/9/2011	2
PB4	3/15/2011	135
PST	3/15/2011	129
p81	3/24/2011	133
p84	3/24/2011	133
p85	3/24/2011	133
p86	3/24/2011	133
p87	3/24/2011	133
p88	3/24/2011	133
p89	3/24/2011	133
p90	3/24/2011	133
p91	3/24/2011	133
p92	3/24/2011	133
p93	3/28/2011	136
p94	3/28/2011	133
p95	3/28/2011	133
p96	5/11/2011	196
p98	5/11/2011	196
p99	5/11/2011	196
p100	5/11/2011	196
p101	5/11/2011	198
p102	5/11/2011	198
p103	5/11/2011	198
p104	5/11/2011	198
p105	5/11/2011	198
p106	5/12/2011	188
p107	5/12/2011	193
p108	5/12/2011	198
p109	5/12/2011	193
p110	5/12/2011	193
p111	5/12/2011	193
p112	5/12/2011	193
p113	5/12/2011	193
p114	5/12/2011	193
p115	5/12/2011	196
p116	5/12/2011	197
p117	5/12/2011	197
p119	5/12/2011	197
p120	5/12/2011	197
p121	5/12/2011	197
p122	5/12/2011	197
p123	5/27/2011	197
p124	5/24/2011	193
p125	5/24/2011	199
p126	5/24/2011	204
p127	5/24/2011	200
p128	6/17/2011	229
p129	6/17/2011	230
p130	6/17/2011	231
p131	6/17/2011	232
p132	6/17/2011	233
p133	6/24/2011	268

p134	6/24/2011	269
p135	6/24/2011	271
p136	6/6/2011	275
p139	6/6/2011	275
p140	6/6/2011	275
p142	1/10/2012	422

Cepa de la que fue aislado	Tipo de Fago aislado
Uy19	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy51	Tipo COS
Uy51	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy01	Tipo COS
Uy01	Tipo COS
Uy01	Tipo COS
Uy01	Tipo COS
Uy01	Tipo COS
Uy01	Tipo COS
Uy01	Tipo COS
Uy01	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy01	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy03	Tipo COS
Uy03	Tipo COS
Uy03	Tipo COS
Uy03	Tipo COS
Uy03	Tipo COS
Uy03	Tipo COS
Uy03	Tipo COS
Uy03	Tipo COS
Uy03	Tipo COS
Uy03	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy19	Tipo COS
Uy03	Tipo COS
Uy40	Tipo COS
Uy40	Tipo COS
Uy40	Tipo COS
Uy40	Tipo COS
Uy40	Tipo COS
Uy40	Tipo COS
Uy40	Tipo COS
Uy40	Tipo COS
Uy40	Tipo COS
Uy40	Tipo COS
Uy51	Tipo COS
Uy01	Tipo COS
Uy01	Tipo COS
Uy01	Tipo COS

[illegible]

Uy02	Tipo COS
Uy02	Tipo COS
Uy23	Tipo COS
Uy23	Tipo COS
Uy23	Tipo COS
Uy02	Tipo COS

CRISPR1 loci

UY-02

CRISPR id : tmp_1_Crispr_1

- CRISPR start position : 132 ----- CRISPR end position : 1685 ----- CRISPR length : 1553
- DR consensus : GTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAAC
- DR length : 36 Number of spacers : 23

132	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	GTGAAATGCTTTTCTAATTCATGTGGTCT	197
198	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	TTAAGTGGTATTATTATATTATCGAAGAAG	263
264	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	GCAACAGTAAAACGTTGCAAACGAAAACCTT	329
330	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	TTCCCGGCGTATATACTGGCTCGATTGTTT	395
396	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	CAATAGTTACCCGAGTACCATCTTCAAGCA	461
462	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	AACACAGCAAGACAAGAGGATGATGCTATG	527
528	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	AGAAGTCACCTCGTGAGAAACACTACTCAAA	593
594	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	CTTTTTTGGCAATCCAACCTGAGAGCCAAG	659
660	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	TGCAAACAAAACAGTGCGATCGCTTGCAAG	725
726	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	AATTAAGGGCATAGAAAGGGAGACAACATG	791
792	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	CGAGTATCAGCAAGCAAGCTGTTAGTTACT	857
858	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	ATAACTATGAAATTTTATAATTTTAAAGA	923
924	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	TGGAAACTAAGAAATGCAATAGAGTGGAAG	989
990	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	AAATCTCGTAGTTAGTACAGTAGGTTTCAA	1055
1056	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	ATAACTGAAGGATAGGAGCTTGTAAGTCT	1121
1122	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	GAAAAAGCATCCATGATAGTGCTTAGACCT	1187
1188	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	AAGTAGTTGATGACCTCTACAATGGTTTAT	1253
1254	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	ACCTAGAAGCATTGAGCGTATATTGATTG	1319
1320	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	AATTTTGCCCCTTCTTTGCCCCCTTGACTAG	1385
1386	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC	ACCATTAGCAATCATTGTGCCCATTGAGT	1451
1452	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC		1517
1518	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC		1583
1584	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC		1649
1650	GT TTT TGT ACT CT CAAG ATTTAAGTAACTGTACAAC		1685

>spacer1 GTGAAATGCTTTTCTAATTCATGTGGTCT	>spacer2 TTAAGTGGTATTATTATATTATCGAAGAAG
>spacer3 GCAACAGTAAAACGTTGCAAACGAAAACCTT	>spacer4 TTCCCGGCGTATATACTGGCTCGATTGTTT
>spacer5 CAATAGTTACCCGAGTACCATCTTCAAGCA	>spacer6 AACACAGCAAGACAAGAGGATGATGCTATG
>spacer7 AGAAGTCACCTCGTGAGAAACACTACTCAAA	>spacer8 CTTTTTTGGCAATCCAACCTGAGAGCCAAG
>spacer9 TGCAAACAAAACAGTGCGATCGCTTGCAAG	>spacer10 AATTAAGGGCATAGAAAGGGAGACAACATG
>spacer11 CGATATTTAAATCATTTTCATAACTTCAT	>spacer12 GCAGTATCAGCAAGCAAGCTGTTAGTTACT
>spacer13 ATAAACTATGAAATTTTATAATTTTAAAGA	>spacer14 TGGAAACTAAGAAATGCAATAGAGTGGAAG
>spacer15 AAATCTCGTAGTTAGTACAGTAGGTTTCAA	>spacer16 ATAACTGAAGGATAGGAGCTTGTAAGTCT
>spacer17 TAATGCTACATCTCAAAGGATGATCCCAGA	>spacer18 GAAAAAGCATCCATGATAGTGCTTAGACCT
>spacer19 TGGAAACTAAGAAATGCAATAGAGTGGAAG	>spacer20 AAGTAGTTGATGACCTCTACAATGGTTTAT
>spacer21 ACCTAGAAGCATTGAGCGTATATTGATTG	>spacer22 AATTTTGCCCCTTCTTTGCCCCCTTGACTAG
>spacer23 ACCATTAGCAATCATTGTGCCCATTGAGT	

Blasting spacers against Genbank database:

Query spacer 1:
GTGAAATGCTTTTCTAATTCATGTGGTCT
Query= (30 letters)

***** No hits found *****
Query spacer 2:
TTAAGTGGTATTATTATATTATCGAAGAAG
Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|FJ965538.1| ST phage 5093
gb|EF529515.1| ST phage 858
gb|AY699705.1| ST phage 2972
gb|AF158600.2|AF158600 ST phage Sfi11
gb|U88974.1| ST temperate phage O1205

>gb|FJ965538.1| ST phage 5093, complete genome
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 ttaagtgtattattatattatcgaagaag 30
Sbjct: 9468 ttaagtgtattattatattatcgaagaag 9497

>gb|EF529515.1| ST phage 858, complete genome
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 ttaagtgtattattatattatcgaagaag 30
Sbjct: 874 ttaagtgtattattatattatcgaagaag 903

>gb|AY699705.1| S.thermophilus phage 2972,
complete genome
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 ttaagtgtattattatattatcgaagaag 30
Sbjct: 874 ttaagtgtattattatattatcgaagaag 903

>gb|AF158600.2|AF158600 S.thermophilus phage
Sfi11, complete genome
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 ttaagtgtattattatattatcgaagaag 30
Sbjct: 944 ttaagtgtattattatattatcgaagaag 973

>gb|U88974.1| S.thermophilus temperate phage
O1205, complete
Identities = 26/26 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 3 aagtgtattattatattatcgaaga 28
Sbjct: 13734 aagtgtattattatattatcgaaga 13759

Query spacer 3:

GCAACAGTAAACGTTGCAAACGAAAACCTT

Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|U88974.1| S.thermophilus temperate phage
O1205

>gb|U88974.1| S.thermophilus temperate phage
O1205, complete
Identities = 29/30 (96%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 gcaacagtaaaacgttgcaaacgaaaactt 30
Sbjct: 13297 gcaacagtaaaacgttgcaaacgaaaactt 13326

Query spacer 4:

TTCCCGGCGTATATACTGGCTCGATTGTTT

Query= (30 letters)

***** No hits found *****

Query spacer 5:

CAATAGTTACCCGAGTACCATCTTCAAGCA

Query= (30 letters)

***** No hits found *****

Query spacer 6:

AACACAGCAAGACAAGAGGATGATGCTATG

Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|FJ965538.1| ST phage 5093
gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778
gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710

>gb|FJ965538.1| ST phage 5093
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacacagcaagacaagaggatgatgctatg 30
Sbjct: 1576 aacacagcaagacaagaggatgatgctatg 1605

>gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778
CRISPR1 locus genomic sequence
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacacagcaagacaagaggatgatgctatg 30
Sbjct: 998 aacacagcaagacaagaggatgatgctatg 1027

>gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710
CRISPR1 locus genomic sequence
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aacacagcaagacaagaggatgatgctatg 30
Sbjct: 866 aacacagcaagacaagaggatgatgctatg 895

Query spacer 7:

AGAAGTCACTCGTGAGAACTACTCAAA

Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|AF145054.1|AF145054 ST phage 7201
gb|CP002889.1| ST phage YMC-2011
emb|FR873482.1| ST salivarius JIM8777
gb|AF115102.1|AF115102 ST phage Sfi19

>gb|AF145054.1|AF145054 S.thermophilus phage
7201, complete genome
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 agaagtcactcgtgagaacactactcaaa 30
Sbjct: 17753 agaagtcactcgtgagaacactactcaaa 17782

>gb|CP002889.1| ST phage YMC-2011, complete genome

Identities = 29/30 (96%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 agaagtcactcgtgagaaacactactcaaa 30

Sbjct: 32213 agaagtcactcgtgagaaacactactcaaa 32242

>emb|FR873482.1| ST salivarius JIM8777 complete genome

Identities = 29/30 (96%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 agaagtcactcgtgagaaacactactcaaa 30

Sbjct: 946042 agaagtcactcgtgagaaacactactcaaa

>gb|AF115102.1|AF115102 S.thermophilus phage Sfi19, complete genome

Identities = 29/30 (96%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 agaagtcactcgtgagaaacactactcaaa 30

Query spacer 8:

CTTTTTTGGCAATCCAACCTGAGAGCCAAG

Query= (30 letters)

***** No hits found *****

Query spacer 9:

TGCAAAACAAAACAGTGGGATCGCTTGCAAG

Query=(30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|AF145054.1|AF145054 S.thermophilus phage 7201

>gb|AF145054.1|AF145054 S.thermophilus phage 7201, complete genome

Identities = 30/30 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 tgcaaaacaaaacagtcgcatcgcttgcaag 30

Sbjct: 9115 tgcaaaacaaaacagtcgcatcgcttgcaag 9144

Query spacer 10:

AATTAAGGGCATAGAAAGGGAGACAACATG

Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778

gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710

>gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778 CRISPR1 locus genomic

Identities = 30/30 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aattaagggcatagaaaggagacaacatg 30

Sbjct: 1195 aattaagggcatagaaaggagacaacatg 1224

>gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710 CRISPR1 locus genomic

Identities = 30/30 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aattaagggcatagaaaggagacaacatg 30

Sbjct: 1063 aattaagggcatagaaaggagacaacatg 1092

Query spacer 11:

CGATATTTAAAATCATTTTCATAACTTCAT

Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778

gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710

>gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778 CRISPR1 locus genomic

Identities = 30/30 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 cgatatttaaaatcattttcataacttcat 30

Sbjct: 1261 cgatatttaaaatcattttcataacttcat 1290

>gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710 CRISPR1 locus genomic

Identities = 30/30 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 cgatatttaaaatcattttcataacttcat 30

Sbjct: 1129 cgatatttaaaatcattttcataacttcat 1158

Query spacer 12:

GCAGTATCAGCAAGCAAGCTGTTAGTTACT

Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778

gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710

gb|CP002889.1| ST phage YMC-2011,

emb|FR873482.1| ST salivarius JIM8777

gb|AF115103.1|AF115103 S.thermophilus phage Sfi21

>gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778 CRISPR1 locus genomic

Identities = 30/30 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 gcagtatcagcaagcaagctgtagttact 30

Sbjct: 1327 gcagtatcagcaagcaagctgtagttact 1356

>gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710 CRISPR1 locus genomic

Identities = 30/30 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 gcagtatcagcaagcaagctgtagttact 30

Sbjct: 1195 gcagtatcagcaagcaagctgtagttact 1224

>gb|CP002889.1| ST phage YMC-2011, complete genome

Identities = 29/30 (96%)

Strand = Plus / Minus

Query: 1 gcagtatcagcaagcaagctgtagttact 30
Sbjct: 30837 gcagaatcagcaagcaagctgtagttact 30808

>emb|FR873482.1| ST salivarius JIM8777 complete genome
Identities = 29/30 (96%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 gcagtatcagcaagcaagctgtagttact 30
Sbjct: 944665 gcagaatcagcaagcaagctgtagttact

>gb|AF115103.1|AF115103 S.thermophilus phage Sfi21, complete genome
Identities = 29/30 (96%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 gcagtatcagcaagcaagctgtagttact 30
Sbjct: 5067 gcagaatcagcaagcaagctgtagttact 5038

Query spacer 13:

ATAAACTATGAAATTTTATAATTTTAAAGA

Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778
gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710
gb|AF145054.1|AF145054 S.thermophilus phage 7201

>gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 ataaactatgaaattttataattttaaga 30
Sbjct: 1393 ataaactatgaaattttataattttaaga 1422

>gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 ataaactatgaaattttataattttaaga 30
Sbjct: 1261 ataaactatgaaattttataattttaaga 1290

>gb|AF145054.1|AF145054 S.thermophilus phage 7201, complete genome
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 ataaactatgaaattttataattttaaga 30
Sbjct: 5338 ataaactatgaaattttataattttaaga 5367

Query spacer 14:

TGGAAACTAAGAAATGCAATAGAGTGGAAG

Query= (30 letters)

***** No hits found *****

Query spacer 15:

AAATCTCGTAGTTAGTACAGTAGGTTTCAA

Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|AF115102.1|AF115102 S.thermophilus phage Sfi19
emb|FR873482.1| ST salivarius JIM8777

>gb|AF115102.1|AF115102 S.thermophilus phage Sfi19, complete genome
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 aaatctcgtagtagtacagtaggtttcaa 30
Sbjct: 1746 aaatctcgtagtagtacagtaggtttcaa 1717

>emb|FR873482.1| ST salivarius JIM8777 complete genome
Identities = 28/28 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 aaatctcgtagtagtacagtaggtttc 28
Sbjct: 939850 aaatctcgtagtagtacagtaggtttc 939823

Query spacer 16:

ATAACTGAAGGATAGGAGCTTGTAAGTCT

Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778
gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710

>gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 ataactgaaggataggagcttgtaaagtct 30
Sbjct: 1921 ataactgaaggataggagcttgtaaagtct 1950

>gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 ataactgaaggataggagcttgtaaagtct 30
Sbjct: 1789 ataactgaaggataggagcttgtaaagtct 1818

Query spacer 17:

TAATGCTACATCTCAAAGGATGATCCCAGA

Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

emb|FR875178.1| S.thermophilus JIM 8232
gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778
gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710
gb|DQ072991.1| S.thermophilus strain CNRZ 1575
gb|AF115103.1|AF115103 ST phage Sfi21
gb|AF115102.1|AF115102 ST phage Sfi19

>emb|FR875178.1| S.thermophilus JIM 8232
complete genome
Identities = 30/30 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 taatgctacatctcaaaggatgatcccaga 30
Sbjct: 715072 taatgctacatctcaaaggatgatcccaga

>gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 taatgctacatctcaaaggatgatcccaga 30
Sbjct: 1987 taatgctacatctcaaaggatgatcccaga 2016

>gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 taatgctacatctcaaaggatgatcccaga 30
Sbjct: 1855 taatgctacatctcaaaggatgatcccaga 1884

>gb|DQ072991.1| S.thermophilus strain CNRZ 1575
CRISPR repeat sequence
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 taatgctacatctcaaaggatgatcccaga 30
Sbjct: 2062 taatgctacatctcaaaggatgatcccaga 2091

>gb|AF115103.1|AF115103 S.thermophilus phage
Sfi21, complete genome
Identities = 29/29 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 2 aatgctacatctcaaaggatgatcccaga 30
Sbjct: 19154 aatgctacatctcaaaggatgatcccaga 19182

>gb|AF115102.1|AF115102 S.thermophilus phage
Sfi19, complete genome
Identities = 29/29 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 2 aatgctacatctcaaaggatgatcccaga 30
Sbjct: 20982 aatgctacatctcaaaggatgatcccaga 21010

Query spacer 18:

GAAAAAGCATCCATGATAGTGCTTAGACCT

Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|CP003499.1| S.thermophilus MN-ZLW-002
gb|EF434468.1| S.thermophilus strain DGCC7796
gb|DQ072990.1| S.thermophilus strain CNRZ 703
gb|AF145054.1|AF145054 ST phage 7201
gb|AF115102.1|AF115102 ST phage Sfi19

>gb|CP003499.1| S.thermophilus MN-ZLW-002,
complete genome
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 gaaaaagcatccatgatagtgccttagacct 30

Sbjct: 631453 gaaaaagcatccatgatagtgccttagacct

>gb|EF434468.1| S.thermophilus strain DGCC7796
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 gaaaaagcatccatgatagtgccttagacct 30
Sbjct: 1326 gaaaaagcatccatgatagtgccttagacct 1355

>gb|DQ072990.1| S.thermophilus strain CNRZ 703
CRISPR repeat sequence
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 gaaaaagcatccatgatagtgccttagacct 30
Sbjct: 1336 gaaaaagcatccatgatagtgccttagacct 1365

>gb|AF145054.1|AF145054 S.thermophilus phage
7201, complete genome
Identities = 26/26 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 gaaaaagcatccatgatagtgccttag 26
Sbjct: 21301 gaaaaagcatccatgatagtgccttag 21276

>gb|AF115102.1|AF115102 S.thermophilus phage
Sfi19, complete genome
Identities = 26/27 (96%)
Strand = Plus / Minus

Query: 4 aaagcatccatgatagtgccttagacct 30
Sbjct: 11554 aaagcatccatgatagtgccttagacct 11528

Query spacer 19:

TGGAAACTAAGAAATGCAATAGAGTGGAAG

Query= (30 letters)

***** No hits found *****

Query spacer 20:

AAGTAGTTGATGACCTCTACAATGGTTTAT

Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778
gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710
emb|AJ239049.2| S.thermophilus partial repA gene

>gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aagtagttgatgacctctacaatggtttat 30
Sbjct: 2053 aagtagttgatgacctctacaatggtttat 2082

>gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aagtagttgatgacctctacaatggtttat 30
Sbjct: 1921 aagtagttgatgacctctacaatggtttat 1950

>emb|AJ239049.2| S.thermophilus partial repA gene,
ORF1 to ORF8 and partial ORF9 DNA
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aagtagttgatgacctctacaatggtttat 30
Sbjct: 1735 aagtagttgatgacctctacaatggtttat 1764

Query spacer 21:
ACCTAGAAGCATTGTGAGCGTATATTGATTG
Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|CP003499.1| S.thermophilus MN-ZLW-002
gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778
gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710
gb|EF434468.1| S.thermophilus strain DGCC7796
gb|DQ072990.1| S.thermophilus strain CNRZ 703

>gb|CP003499.1| S.thermophilus MN-ZLW-002,
complete genome
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 acctagaagcatttgagcgtatattgattg 30
Sbjct: 631914 acctagaagcatttgagcgtatattgattg 631943

>gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 acctagaagcatttgagcgtatattgattg 30
Sbjct: 2119 acctagaagcatttgagcgtatattgattg 2148

>gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 acctagaagcatttgagcgtatattgattg 30
Sbjct: 1987 acctagaagcatttgagcgtatattgattg 2016

>gb|EF434468.1| S.thermophilus strain DGCC7796
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 acctagaagcatttgagcgtatattgattg 30
Sbjct: 1787 acctagaagcatttgagcgtatattgattg 1816

>gb|DQ072990.1| S.thermophilus strain CNRZ 703
CRISPR repeat sequence
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 acctagaagcatttgagcgtatattgattg 30
Sbjct: 1797 acctagaagcatttgagcgtatattgattg 1826

Query spacer 22:
AATTTTGCCCCTTCTTTGCCCTTGACTAG
Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|CP003499.1| S.thermophilus MN-ZLW-002
gb|CP002340.1| S.thermophilus ND03
gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778
gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710
gb|EF434468.1| S.thermophilus strain DGCC7796
gb|DQ072990.1| S.thermophilus strain CNRZ 703
gb|FJ965538.1| ST phage 5093

>gb|CP003499.1| S.thermophilus MN-ZLW-002,
complete genome
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aattttgccccttctttgcccttgactag 30
Sbjct: 631980 aattttgccccttctttgcccttgactag 632009

>gb|CP002340.1| S.thermophilus ND03, complete
genome
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aattttgccccttctttgcccttgactag 30
Sbjct: 641790 aattttgccccttctttgcccttgactag 641819

>gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aattttgccccttctttgcccttgactag 30
Sbjct: 2185 aattttgccccttctttgcccttgactag 2214

>gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aattttgccccttctttgcccttgactag 30
Sbjct: 2053 aattttgccccttctttgcccttgactag 2082

>gb|EF434468.1| S.thermophilus strain DGCC7796
CRISPR1 locus genomic
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aattttgccccttctttgcccttgactag 30
Sbjct: 1853 aattttgccccttctttgcccttgactag 1882

>gb|DQ072990.1| S.thermophilus strain CNRZ 703
CRISPR repeat sequence
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aattttgccccttctttgcccttgactag 30
Sbjct: 1863 aattttgccccttctttgcccttgactag 1892

>gb|FJ965538.1| ST phage 5093, complete genome

Identities = 24/24 (100%)

Strand = Plus / Minus

Query: 1 aattttgccccttctttgcccctt 24

Sbjct: 32527 aattttgccccttctttgcccctt 32504

Query spacer 23:

ACCATTAGCAATCATTTGTGCCCAT TGAGT

Query= (30 letters)

Sequences producing significant alignments:

gb|CP003499.1| S.thermophilus MN-ZLW-002

gb|CP002340.1| S.thermophilus ND03

gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778

gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710

gb|EF434468.1| S.thermophilus strain DGCC7796

gb|DQ072990.1| S.thermophilus strain CNRZ 703

>gb|CP003499.1| S.thermophilus MN-ZLW-002,
complete genome

Identities = 30/30 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 accattagcaatcatttgtgccattgagt 30

Sbjct: 632112 accattagcaatcatttgtgccattgagt 632141

>gb|CP002340.1| S.thermophilus ND03, complete
genome

Identities = 30/30 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 accattagcaatcatttgtgccattgagt 30

Sbjct: 641856 accattagcaatcatttgtgccattgagt 641885

>gb|EF434470.1| S.thermophilus strain DGCC7778

CRISPR1 locus genomic

Identities = 30/30 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 accattagcaatcatttgtgccattgagt 30

Sbjct: 2251 accattagcaatcatttgtgccattgagt 2280

>gb|EF434469.1| S.thermophilus strain DGCC7710

CRISPR1 locus genomic

Identities = 30/30 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 accattagcaatcatttgtgccattgagt 30

Sbjct: 2119 accattagcaatcatttgtgccattgagt 2148

>gb|EF434468.1| S.thermophilus strain DGCC7796

CRISPR1 locus genomic

Identities = 30/30 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 accattagcaatcatttgtgccattgagt 30

Sbjct: 1985 accattagcaatcatttgtgccattgagt 2014

>gb|DQ072990.1| S.thermophilus strain CNRZ 703

CRISPR repeat sequence

Identities = 30/30 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 accattagcaatcatttgtgccattgagt 30

Sbjct: 1995 accattagcaatcatttgtgccattgagt 2024