

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Interacciones entre bacteriocinas y
bacteriófagos durante las fermentaciones
lácteas”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR**

CLAUDIA RENDUELES MARTÍNEZ

JUNIO, 2020



Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer al personal del Instituto de Productos Lácteos de Asturias su excepcional acogida durante mi estancia allí, especialmente a los miembros del grupo de Fermentos Lácticos y Bioconservación (DairySafe), por su ayuda durante la realización de este trabajo.

Quisiera agradecer también a mis supervisoras Beatriz Martínez y Ana Rodríguez por todos los conocimientos y ayuda aportados durante este tiempo.

Y, por último, pero no menos importante, quisiera agradecer a mi familia y amigos su incondicional apoyo no solo durante el desarrollo de este trabajo fin de máster, sino durante toda mi formación académica.

Resumen

La presencia de bacteriófagos en la industria láctea supone un problema importante, al causar pérdidas de eficacia o incluso la detención completa de las fermentaciones llevadas a cabo por bacterias del ácido láctico. Resulta importante, por tanto, el desarrollo de estrategias que permitan minimizar el riesgo de dichos fallos, teniendo en cuenta que, dadas las condiciones en las que tienen lugar estas fermentaciones, la eliminación completa de los fagos no es posible. Este trabajo tiene como objetivo el estudio de la interacción de bacteriocinas y fagos en relación a su actividad frente a *Lactococcus*, tratando de desarrollar una estrategia que permita disminuir la sensibilidad de esta bacteria a los fagos. Así, se desarrollaron varios experimentos empleando distintas bacteriocinas (Lcn972, nisina, LcnA) y el bacteriófago sk1 frente a *L. lactis* MG1363, por separado y combinando las distintas bacteriocinas con el fago, obteniendo algunos resultados reseñables. En primer lugar, es destacable que tanto la infectividad del fago sk1 como la actividad inhibitoria de las bacteriocinas dependen del tamaño del inóculo inicial empleado, siendo su actividad dependiente de la presencia de calcio y/o magnesio en el caso del fago sk1, e independiente en el caso de la Lcn972 y la nisina. En relación a los experimentos en los que se realizó un cultivo simultáneo con Lcn972 y fago sk1, se observó un efecto sinérgico en las primeras fases, viéndose favorecida la lisis bacteriana causada por el fago con la presencia de la bacteriocina. En la fase final, sin embargo, la presencia de Lcn972 parece favorecer la posterior recuperación de los cultivos, una vez ha tenido lugar la lisis. Estos resultados apoyan, por tanto, el posible desarrollo de una estrategia basada en la preadaptación a la Lcn972 para mejorar la resistencia de *L. lactis* a bacteriófagos.

Abstract

A common problem on dairy fermentations is the presence of bacteriophages which infect dairy starters used to make products like cheese. These phages cause the lysis of bacteria, so they slow down or even cause the complete failure of milk fermentation. Considering this, it's important to develop strategies to reduce such a risk. Here, the objective was to study the interactions among bacteriocins and phages in *Lactococcus* in order to design a strategy to reduce phage activity against this bacterium using bacteriocins. Several experiments were carried out using different bacteriocins (Lcn972, nisin and LcnA) and phage sk1, separately and in combination. An interesting result is the fact that bacteriocin and phage activity depend on the inoculum size. The requirement of calcium and/or magnesium for phage infection is also important, while these ions are not necessary for bacteriocin activity. When using together Lcn972 and phage sk1, it has been noted that Lcn972 has a synergistic effect and accelerates cell lysis after phage infection, while it seems to stimulate bacteria re-growth on the final steps. These results suggest the possibility of a new strategy to reduce *Lactococcus* sensibility to phages using Lcn972 preadaptated cultures.

Lista de figuras

Figura 1. Micrografía de <i>L. lactis</i> obtenida mediante microscopía electrónica.	5
Figura 2. Esquema del desarrollo viral.	6
Figura 3. Micrografías de transmisión electrónica de fagos pertenecientes a distintas familias.	6
Figura 4. Placas de lisis formadas por el fago sk1 sobre la cepa indicadora <i>L. lactis</i> MG1363.	15
Figura 5. Producción de lactococina A en <i>L. lactis</i> B190 a lo largo de la curva de crecimiento.	16
Figura 6. Curvas representativas del crecimiento de <i>L. lactis</i> MG1363 en presencia de distintas concentraciones de fago sk1.	18
Figura 7. Curvas representativas del crecimiento de <i>L. lactis</i> MG1363 en presencia de distintas concentraciones de fago Lcn972.	20
Figura 8. Curvas representativas del crecimiento de <i>L. lactis</i> MG1363 en presencia de distintas concentraciones de nisina.	22
Figura 9. Curvas representativas del crecimiento de <i>L. lactis</i> MG1363 en presencia de distintas concentraciones de LcnA.	23
Figura 10. Curvas representativas del crecimiento de <i>L. lactis</i> MG1363 en presencia de fago sk1 y Lcn972.	26
Figura 11. Representación de la DO ₆₀₀ máxima alcanzada en el momento de la lisis. ...	27
Figura 12. Representación de la DO ₆₀₀ tras 24 horas de incubación.	28
Figura 13. Curvas representativas del crecimiento de <i>L. lactis</i> MG1363 en presencia de fago y nisina.	31
Figura 14. Curva obtenida en el experimento de la curva de un solo paso de un bacteriófago.	35
Figura 15. Cinética de acidificación de las cepas sensibles y resistentes a bacteriófagos en leche.	36

Lista de tablas

Tabla 1. Especies más empleadas como cultivos iniciadores en la elaboración de productos lácteos fermentados.	4
Tabla 2. Títulos obtenidos empleando distintas estrategias de propagación del fago sk1	15

Tabla 3. Valores de la MIC de las distintas bacteriocinas en presencia y ausencia de calcio.

..... 24

Lista de abreviaturas

- BAL: bacterias del ácido láctico
- CES: cell envelope stress
- CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm
- GRAS: generalmente considerado seguro
- HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia
- Lcn972: lactococina 972
- LcnA: lactococina A
- MIC: concentración mínima inhibitoria
- MOI: multiplicity of infection
- UA: unidades arbitrarias de actividad
- Ufc: unidades formadoras de colonias
- Ufp: unidades formadoras de placas

Índice

Antecedentes.....	1
Consideraciones teóricas	3
Cultivos iniciadores o starters en la industria láctea.....	3
Fagos que infectan a las bacterias lácticas.....	5
Interacciones fago-bacteria: pared celular bacteriana	7
Bacteriocinas	8
Respuesta CES en Lactococcus	9
Interacciones entre distintos antimicrobianos.....	10
Material y métodos	11
Microorganismos y condiciones de cultivo	11
Titulación.....	11
Propagación del fago sk1	12
Obtención de lactococcina A y determinación de su actividad	12
Curvas de crecimiento en diferentes condiciones	13
Determinación de la influencia del calcio y del magnesio en la actividad inhibitoria de las bacteriocinas frente a <i>L. lactis</i> MG1363	14
Determinación de la interacción fago-bacteriocina	14
Tratamiento de datos y estadística.....	14
Resultados y discusión	15
Propagación del fago sk1	15
Obtención de LcnA.....	16
Crecimiento de <i>L. lactis</i> MG1363 en presencia del fago sk1	17
Crecimiento de <i>L. lactis</i> MG1363 en presencia de Lcn972	19
Crecimiento de <i>L. lactis</i> MG1363 en presencia de nisina	21
Crecimiento de <i>L. lactis</i> MG1363 en presencia de LcnA	22
Influencia del calcio y magnesio en la actividad inhibitoria de la Lcn972 y la nisina frente a <i>L. lactis</i> MG1363.....	24

Efecto combinado de la bacteriocina Lcn972 y el fago sk1 en el crecimiento de <i>L. lactis</i> MG1363.....	24
Efecto combinado de la nisina y el fago sk1 en el crecimiento de <i>L. lactis</i> MG1363. .	29
Perspectivas futuras	31
Correlación del modo de acción de distintas bacteriocinas y la infección por el fago sk1	32
Curva de crecimiento de un solo paso del fago sk1	32
Resistencia de <i>L. lactis</i> MG1363 tras la exposición al fago sk1 y Lcn972	34
Diseño de una estrategia de control del fago sk1 en fermentaciones lácteas	35
Conclusiones.....	37
Bibliografía.....	38

Antecedentes

La leche y sus derivados han jugado desde siempre un papel importante en la dieta debido a su alto valor nutricional, destacando entre sus derivados el queso, cuya elaboración requiere de la presencia y/o adición de bacterias lácticas (Hinrichs, 2004). Estas bacterias, denominadas cultivos iniciadores cuando son añadidas, pertenecen a diversas especies, siendo las más empleadas las del género *Lactococcus*. Su función es fermentar la lactosa presente en la leche transformándola en ácido láctico, disminuyendo por tanto el pH y provocando la coagulación de la leche debido a la agregación de las micelas de caseína. Este primer paso en la fabricación de queso resulta de vital importancia y determina las características finales del producto (Kindstedt, 2013). Sin embargo, en las condiciones en las que se desarrollan estas fermentaciones, resulta imposible evitar la presencia de bacteriófagos (fagos) que infectan a estas bacterias, provocando su lisis y deteniendo o ralentizando el proceso, si superan un determinado umbral de concentración, difícil de determinar y que varía de unos autores a otros. En general, una concentración de 10^2 unidades formadoras de placas (ufp) por mL es suficiente para provocar problemas en las fermentaciones, mientras que concentraciones de 10^5 - 10^6 ufp/mL provocan el fallo completo de dicho proceso. En cualquier caso, dan lugar a productos de menor calidad y en algunos casos provocan incluso el fallo completo de la fermentación, lo que supone importantes pérdidas económicas, por lo que su control resulta imprescindible (Garneau y Moineau, 2011; Moineau y Lèvesque, 2004).

El origen de estos bacteriófagos puede ser muy diverso, pudiendo estar presentes en las materias primas (hasta 10^4 ufp/mL en leche cruda), los propios cultivos bacterianos (profagos abundantes), las superficies de trabajo o en el aire (10^8 ufp/m³). El hecho de que la materia prima no sea estéril, unido a que las fermentaciones no se desarrollan en instalaciones controladas, hace que las industrias lácteas sean las más sensibles a este tipo de infección. Teniendo en cuenta esto, dichas industrias siguen distintas estrategias para disminuir el riesgo de infección por bacteriófagos, que van desde la higienización de superficies y ambientes de trabajo o el tratamiento de las materias primas hasta la rotación de distintas cepas bacterianas como cultivos iniciadores. Sin embargo, la variable resistencia de los bacteriófagos a los distintos biocidas y tratamientos térmicos y de elevadas presiones hidrostáticas hace que estas estrategias no sean del todo eficaces. Es por ello por lo que los mayores esfuerzos se centran en el control microbiológico, manteniendo una periódica y exhaustiva detección de fagos ambientales y mediante el

desarrollo o aislamiento de cepas resistentes aprovechando los sistemas anti-fago naturales, que pueden actuar a distintos niveles: inhibición de la adsorción a la pared celular, inhibición de la inyección del ADN fágico, destrucción de los ácidos nucleicos fágicos, RNA antisentido, los sistemas CRISPR/Cas, etc. Pese a todo, la continua y rápida evolución de los fagos dificulta esta tarea. Este hecho, unido al enorme impacto negativo en la producción vuelven completamente necesaria la investigación en este sector y la búsqueda permanente de nuevas estrategias anti-fago (Samson y Moineau, 2013; Pujato et al., 2019).

En relación con esto, puesto que la pared celular bacteriana es una estructura clave en el proceso de infección, parece lógico su estudio en profundidad, en relación con la interacción fago-bacteria. Así, el fago interacciona con la pared celular primero durante el reconocimiento y adsorción y, finalmente, rompe dicha estructura para liberar las partículas virales formadas (Chapot-Chartier, 2014). Respecto a ello, existen estudios que relacionan modificaciones en la pared con una mayor o menor susceptibilidad a la infección fágica, debidas no solo a la modificación de los receptores que el fago emplea para su adsorción, sino que también afectan a la actividad de la endolisina, la enzima fágica responsable de la lisis bacteriana (Forde y Fitzgerald, 2003; Escobedo et al., 2019). Sin embargo, estos estudios son escasos e insuficientes, siendo necesaria mucha más investigación al respecto. Relacionada con estas modificaciones es de interés la denominada respuesta CES (cell envelope stress), que engloba el conjunto de mecanismos implicados en la detección del daño de la pared celular (señalización) y los implicados en contrarrestar el daño ocasionado (respuesta) que, entre otros, incluyen modificaciones en la pared celular (Jordan et al., 2008). Esta respuesta se activa, por ejemplo, por la presencia de diversos antimicrobianos como bacteriocinas que interfieren con la síntesis de la pared celular (Martínez et al., 2007). Estas modificaciones podrían afectar a la sensibilidad a los fagos. Aunque esto por el momento no se haya demostrado, existen algunos resultados prometedores. Por ejemplo, se ha aislado un mutante de *L. lactis* resistente a la bacteriocina lactococina 972 (Lcn972), que es resistente al fago c2 y con una menor sensibilidad a al fago sk1 que la cepa original (Roces et al. 2012). Tomando como referencia estas observaciones, los objetivos de este estudio serán los siguientes:

- Determinar la interacción entre distintas bacteriocinas (Lcn972, nisina y lactococina A (LcnA)) y el fago sk1, en relación a su actividad inhibitoria frente a la cepa *Lactococcus lactis* MG1363 in vitro.

- Diseñar una estrategia basada en bacteriocinas para mejorar el rendimiento de una fermentación láctea en presencia del fago sk1.

Consideraciones teóricas

Cultivos iniciadores o starters en la industria láctea

Existe una gran variedad de productos obtenidos a partir de la fermentación de la leche, como pueden ser el queso, el yogurt o la mantequilla, entre otros. Las fermentaciones tradicionales se realizaban sin adición de microorganismos, aprovechando la microbiota presente de forma natural en las materias primas. Sin embargo, en la actualidad, y especialmente en las fermentaciones industriales, estas se basan en la selección de cultivos iniciadores con características específicas que garantizan, además de la seguridad alimentaria imprescindible, la textura y el sabor buscados (Kindstedt, 2013).

Su acción principal en la elaboración de estos productos es la acidificación del medio, fundamentalmente mediante la producción de ácido láctico. Esta acidificación tiene una doble finalidad; por una parte, dificulta el desarrollo de muchos microorganismos patógenos, proporcionando así un componente importante de seguridad alimentaria. Por otra parte, se trata de un proceso fundamental en la coagulación de la leche, el primer paso en la elaboración de productos como el queso o el yogurt. Debido al crecimiento y principalmente, a la transformación por parte de estas bacterias de la lactosa presente en la leche en ácido láctico, el pH alcanza un valor próximo a 4.6, que se corresponde con el punto isoeléctrico de la caseína, la principal proteína de la leche. La acumulación de protones neutraliza la superficie polar de las micelas de caseína, haciendo que sean incapaces de interaccionar con el agua y forzando la interacción de unas micelas con otras hasta la formación de agregados o cadenas que aumentan de longitud hasta la formación de una red tridimensional que atrapa los principales componentes de la leche, transformando así la materia prima líquida en un medio sólido que es la base para las transformaciones posteriores (Hill et al., 2017; Kindstedt, 2013).

Por ello, la selección de los microorganismos más apropiados en cada caso se basa en su capacidad de acidificación, la producción de exopolisacáridos, la actividad proteolítica y la generación de metabolitos bioactivos, entre otros factores, todos ellos componentes que influyen en la textura, el aroma y el sabor del producto final. Estos cultivos iniciadores se basan en el uso de bacterias del ácido láctico (BAL), un grupo de bacterias Gram positivas, principalmente anaerobias y no esporuladas, que producen ácido láctico como

principal producto de la fermentación de azúcares. Entre ellas se incluyen bacterias homofermentativas, que producen únicamente ácido láctico y bacterias heterofermentativas, que dan lugar a la formación de otros productos como etanol, CO₂ o ácido acético; y que pueden tener un mayor o menor interés dependiendo del objetivo buscado con la fermentación. Las denominadas BAL engloban diversos géneros, entre los que se incluyen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Enterococcus* (Hill et al., 2017; Cavanagh et al., 2015).

La tabla 1 muestra algunos ejemplos de las especies más ampliamente utilizadas en la elaboración de los distintos productos lácteos fermentados (Hati et al., 2013).

Tabla 1. Especies más empleadas como cultivos iniciadores en la elaboración de productos lácteos fermentados (Hati et al., 2013).

Producto	Starter
Quesos duros sin ojos	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
Quesos con ojos pequeños	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetalys</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
Quesos suizos e italianos	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Mantequilla y suero lácteo	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
Yogurt	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Leche fermentada, leche probiótica	<i>L. casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium brevis</i>
Kefir	<i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus kefiranofacies</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>

En la producción de queso se usa, generalmente, *Lactococcus lactis* (figura 1) como starter. Se trata de una bacteria homofermentativa Gram positiva, que posee el estatus GRAS (generalmente considerado seguro), con un amplio rango de aplicaciones biotecnológicas (Linares et al., 2010) Su genoma es relativamente pequeño con unos 2000-2800 genes codificantes de proteínas, siendo destacable la presencia en cepas industriales de grandes complementos plasmídicos que llegan a contribuir hasta 200 kb al genoma total y que confieren ventajas competitivas a la bacteria relacionadas con la resistencia a bacteriófagos, la utilización de la lactosa o la digestión de la caseína. Desde los años 80, tras el desarrollo de un protocolo de transformación, la ingeniería genética se convirtió en una herramienta fundamental y habitual en el estudio y desarrollo de cultivos iniciadores adecuados para cada tipo de queso y condiciones requeridas, intentando en cualquier caso superar las principales dificultades encontradas en la elaboración de dicho producto. En el mismo sentido, su metabolismo ha sido ampliamente estudiado, al estar directamente relacionado con las características organolépticas del producto final. Se trata, por tanto, de una especie muy conocida y estudiada, pero en continua evolución y búsqueda de nuevas cepas con características interesantes en relación a sus propiedades en la fermentación de leche (Cavanagh et al., 2015).

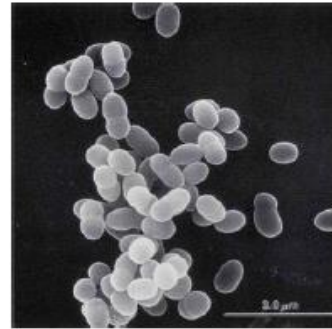


Figura 1. Micrografía de *L. lactis* obtenida mediante microscopía electrónica. (Hernández, 2007)

La cepa empleada en este estudio, *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 (GenBank Accession Nº: AM406671) es el estándar empleado en los estudios genéticos de bacterias lácticas. Se trata de una cepa libre de plásmidos y, por tanto, robusta y fácil de modificar genéticamente. Es además susceptible a muchos fagos de *Lactococcus* (Wegmann et al., 2007).

Fagos que infectan a las bacterias lácticas

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan a bacterias, constituidos por un ácido nucleico (ARN o ADN de cadena sencilla o doble) y una cápsida proteica. El 95% de ellos poseen además una cola que alberga las funciones de reconocimiento de la bacteria sensible. En general, el desarrollo viral comienza con el reconocimiento específico de la célula a infectar y la inyección del material genético en esta. A continuación, se replica, transcribe y se traduce, generando nuevos viriones que serán liberados tras la lisis bacteriana. En algunos casos, se produce la integración del genoma viral en el genoma

celular, lo que diferencia el ciclo lisogénico del ciclo lítico. La figura 2 muestra un sencillo esquema de ambos. Existe una gran variedad de fagos que se clasifican en función del tipo de ácido nucleico, así como de la estructura de su cápsida y de su cola, en diferentes órdenes y familias (Suárez, 2019).

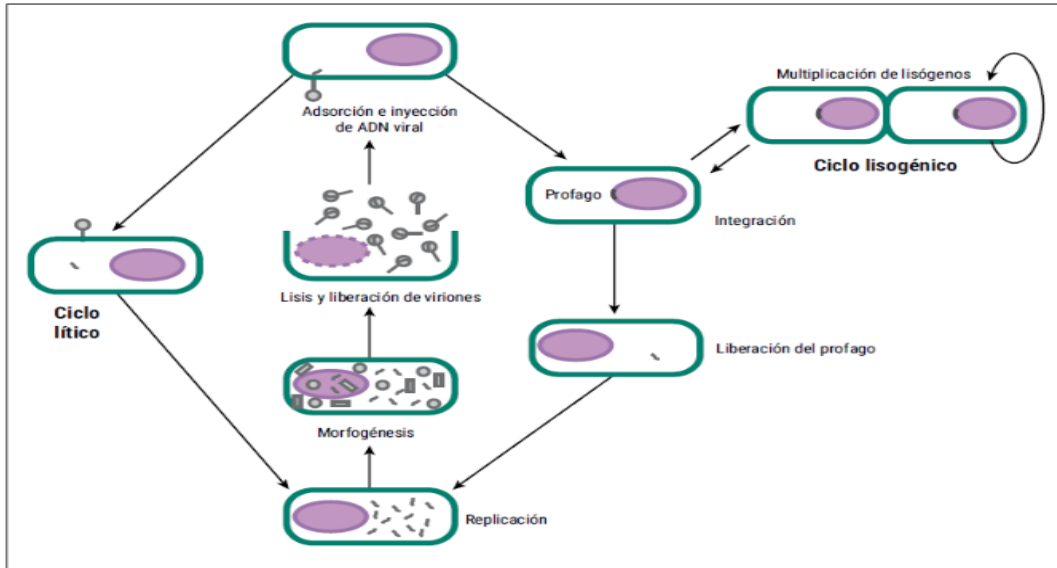


Figura 2. Esquema del desarrollo viral. Una vez que el material genético es inyectado en la célula, este puede replicarse y dar lugar a la formación de nuevos viriones (ciclo lítico) o integrarse en el genoma dando lugar a un profago (ciclo lisogénico), que puede independizarse posteriormente e iniciar el ciclo lítico (Suárez, 2019).

El reconocimiento de la célula por parte del fago es muy específico. Existen distintos fagos relacionados con las bacterias lácticas y, en concreto, con aquellas implicadas en la producción de queso. Los fagos que infectan a *Lactococcus* pertenecen al orden *Caudovirales*, un grupo taxonómico de gran diversidad genética y morfológica que incluye un 95% de todos los fagos conocidos. Este orden engloba 3 familias: *Myoviridae* (colas largas y contráctiles), *Siphoviridae* (colas largas no contráctiles) y *Podoviridae* (colas cortas). Los fagos de *Lactococcus* pertenecen fundamentalmente a la familia *Siphoviridae*, existiendo algunos miembros de la familia *Podoviridae*. En la figura 3 se observan micrografías de transmisión electrónica de bacteriófagos pertenecientes a las diferentes familias.

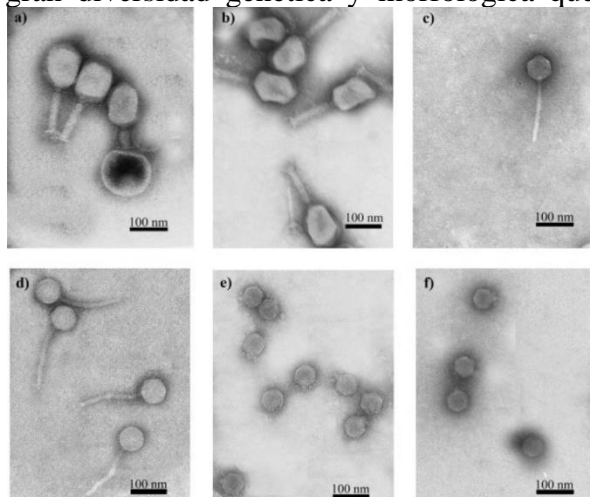


Figura 3. Micrografías de transmisión electrónica de fagos pertenecientes a la familia *Myoviridae* (a, b), a la familia *Siphoviridae* (c, d) y a la familia *Podoviridae* (e, f) (Hernández, 2007).

Los fagos de *L. lactis* se clasifican en 10 grupos, perteneciendo la mayoría a 3: c2 y 936

(fagos líticos), así como al grupo P335, que incluye fagos virulentos y atemperados. Se trata en cualquier caso de fagos muy bien estudiados y caracterizados (Deveau et al., 2006).

En concreto, en este estudio, se empleará el fago sk1, perteneciente a la familia *Siphoviridae* y, en concreto, al grupo 936. Se trata de un fago con cabeza isométrica y cola flexible, cuyo genoma, de 28000 pares de bases de longitud, está compuesto por ADN de doble cadena (Chandry et al., 1994).

Interacciones fago-bacteria: pared celular bacteriana

La pared celular bacteriana juega un papel fundamental en la interacción específica entre el virus y la bacteria durante todo el ciclo de infección: el virus reconoce estructuras específicas expuestas en la pared celular, la inyección del material genético se realiza mediante la formación de poros en la pared y, finalmente, la lisis celular se produce por su degradación. Por ello, el conocimiento de dicha estructura, en concreto en las bacterias empleadas como starters, resulta fundamental. La pared celular de las bacterias Gram positivas, como es el caso de *Lactococcus*, está formada por diversos biopolímeros: peptidoglicano, polisacáridos, ácidos teicoicos y (glico-)proteínas; siendo el componente principal el peptidoglicano. Este último se compone de cadenas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico alternantes que se unen mediante puentes peptídicos. Se trata de una estructura que es el resultado de complejas reacciones de biosíntesis, maduración y degradación. El peptidoglicano forma una estructura reticular alrededor de la bacteria a la cual se unen covalentemente o no el resto de componentes de la pared celular. En cuanto a los componentes polisacáridicos de la superficie bacteriana, estos pueden dividirse en 3 grupos: polisacáridos capsulares, polisacáridos de la pared y polisacáridos extracelulares (Chapot-Chartier, 2014). En concreto en la cepa MG1363 un polisacárido de pared formado por unidades repetidas de un fosfohexasacárido forma una capa compacta alrededor de la bacteria que se denomina película y que es necesaria para el normal desarrollo y división celular. Estos polisacáridos de pared presentan una gran diversidad entre cepas de la misma especie. Los ácidos teicoicos son glicopolímeros ricos en fosfato que se clasifican en dos grandes grupos en función de si están unidos covalentemente al peptidoglicano o se encuentran anclados a la membrana citoplasmática mediante un glicolípido (Chapot-Chartier, 2014).

Respecto al papel de la pared celular en la interacción con los bacteriófagos se han identificado componentes proteicos y no proteicos como receptores. En el caso del fago sk1, la película formada por el polisacárido de pared celular antes comentado actúa como receptor, determinando el limitado rango de hospedadores de este fago. Respecto a la formación de poros en la pared y a la lisis bacteriana, el principal componente objeto de estudio es el peptidoglicano, sobre el que actúan las endolisinas (enzimas fágicas) responsables de dicha lisis (Chapot-Chartier, 2014).

Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por algunas bacterias, entre las que se encuentran las bacterias lácticas. Existen diversos tipos, que se pueden clasificar en 3 grupos en función de sus propiedades fisicoquímicas. Las bacteriocinas de clase I y II son moléculas de pequeño tamaño (< 10 kDa) y termoestables, con modificaciones postranscripcionales las de clase I y sin modificaciones las de clase II. Las bacteriocinas de clase III son termolábiles y de mayor peso molecular, en general > 30 kDa. Respecto a su modo de acción, en general, las bacteriocinas basan su actividad antimicrobiana en la formación de poros en la membrana plasmática y/o en la inhibición de la síntesis de pared celular (Mills et al., 2017).

Las bacteriocinas producidas por bacterias del ácido láctico son sensibles a varias proteasas humanas, por lo que su impacto en la microbiota es mínimo. Esto unido a su potente actividad, incluso a concentraciones en el rango nanomolar, hace interesante su presencia en alimentos como control de bacterias indeseables (Mills et al., 2017).

En este estudio se emplearán 3 bacteriocinas, con diferentes modos de acción: Lcn972, LcnA y nisina. La Lcn972 es una bacteriocina de 66 aminoácidos cargada positivamente, cuya estructura adopta una conformación sándwich de tipo β , constituida por 2 láminas β antiparalelas compuestas de 3 hebras cada una (Turner et al., 2013). Se trata de una bacteriocina producida por la cepa de *L. lactis* IPLA972. Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de peptidoglicano, impidiendo la incorporación de sus componentes al interaccionar con el lípido II, uno de sus precursores. Esta inhibición tiene lugar concretamente en la formación septo durante la división celular (Martínez et al., 2000; Martínez et al., 2008).

La LcnA, producida por *L. lactis* ssp. *cremoris* LMG2130, se encuentra formada por 54 aminoácidos, siendo rica en alanina y glicina, con solo 3 aminoácidos cargados y de

carácter hidrofóbico. Su mecanismo de acción se basa en la formación de poros (Holo et al., 1991).

Por último, la nisina es una bacteriocina de clase I, un péptido catiónico y anfifílico de 34 aminoácidos, cuyo mecanismo de acción en Gram positivas se basa en la formación de poros en la membrana bacteriana y en la inhibición de la síntesis de peptidoglicano. La nisina interacciona con el lípido II, secuestrándolo y formando canales en la membrana plasmática (Galván-Márquez et al., 2020; Wiedemann et al., 2001).

Las bacteriocinas formadoras de poros adoptan una estructura de hélice α en el entorno de la membrana bacteriana que permite la formación de dichos poros. Esta formación comienza con una interacción electrostática entre la bacteriocina y la membrana, seguida en su caso con la unión a su receptor y de la agregación de los péptidos que se translocan a través de la membrana. Esta alteración en la membrana reduce o elimina el gradiente de protones, provocando la muerte celular. En el caso de la Lcn972 como consecuencia de la inhibición de la formación del septo, la célula se alarga y finalmente muere. Cabe destacar de esta bacteriocina su especificidad, pues tiene actividad únicamente frente a *Lactococcus*, al igual que la lactococina A, mientras que la nisina es de amplio espectro (Martínez et al., 2016).

Respuesta CES en Lactococcus

La respuesta CES en bacterias Gram positivas se activa ante el daño de la envuelta celular y, consecuentemente, incluye componentes que detectan dicho daño (estímulo) en el espacio extracelular. Se han identificado varios sistemas de respuesta CES, la mayoría de los cuales se encuentran formados por 2 proteínas: un sensor de membrana (sensor histidin-quinasa o factor anti- σ) y un regulador transcripcional (regulador de respuesta o factor σ , respectivamente). Cuando el sensor percibe un estímulo, se activa el regulador, que modifica (normalmente activa) la expresión de los genes diana implicados en la respuesta (Jordan et al., 2008).

En el caso de *L. lactis*, CesSR es el sistema de dos componentes responsable de la respuesta CES en esta bacteria. CesS es la histidín quinasa que detecta el estímulo y CesR el regulador transcripcional. Este sistema se activa en presencia de Lcn972 o de lisozima y regula hasta 21 genes, algunos de los cuáles modifican las propiedades de la pared celular. Algunos de los operones inducidos por la Lcn972 se encuentran relacionados con la biosíntesis o la modificación del peptidoglicano (Martínez et al., 2007).

Interacciones entre distintos antimicrobianos

La constante búsqueda de nuevos tratamientos antimicrobianos en la lucha contra los patógenos más habituales ha permitido establecer relaciones de sinergismo entre diversos antimicrobianos y en concreto, entre bacteriófagos y bacteriocinas. En un inicio esta búsqueda se basó en la combinación de distintos antibióticos (el tratamiento más habitual en estos casos) entre sí y con otras sustancias, con el objetivo de obtener un efecto sinérgico, una mayor eficacia contra el patógeno en cuestión de la obtenida empleando cada sustancia por separado. En este sentido, se observó dicho efecto entre la colistina y el imipenem en el tratamiento de *Pseudomonas aeruginosa* (Wróblewska, 2006), así como entre alcaloides vegetales y tetraciclina frente a *Staphylococcus aureus*, entre otros muchos ejemplos (Hemaiswarya et al., 2008). El descubrimiento o mayor estudio de otros antimicrobianos como las bacteriocinas llevó a la combinación de estas entre sí y con diversas sustancias; como en el caso de la combinación de la bacteriocina AS-48 con etambutol (antibiótico) como tratamiento contra *Mycobacterium tuberculosis* (Aguilar-Pérez et al., 2018). En el mismo sentido, la combinación de bacteriófagos con antibióticos ha sido también estudiada, encontrando resultados de sinergismo en el uso combinado de ceftriaxona y fagos de *P. aeruginosa* (Knezevic et al., 2013) o en la combinación del fago T4 y cefotaxima frente a *Escherichia coli* (Ryan et al., 2012). Así, resulta lógico pensar en la combinación de bacteriófagos y bacteriocinas con el mismo objetivo, siendo cada vez más numerosos los estudios al respecto. Por ejemplo, se ha observado un efecto sinérgico en la combinación de nisina con fagos específicos de *Listeria monocytogenes* (Leverentz et al., 2003), así como en el uso combinado de nisina y fagos específicos de *Staphylococcus aureus* (Martínez et al., 2008).

Se han descrito también relaciones de antagonismo entre distintos antibióticos, como en el caso de la penicilina en combinación con eritromicina contra *Streptococcus pneumoniae* (Johansen et al., 2000), o de antibióticos bacteriostáticos (macrólidos, tetraciclinas) en combinación con gentamicina frente a biofilms de *S. aureus* (Dall et al., 2018). Por otra parte, se ha descrito un efecto antiviral de sustancias como el quitosano o el CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) frente a bacteriófagos de *Lactococcus* o de *E. coli* (Ly-Chatain et al., 2013). Como puede observarse, pese a que los trabajos relacionados con la búsqueda de un efecto sinérgico bacteriocina-fago son cada vez más habituales, no existe apenas bibliografía sobre el uso combinado de bacteriocinas y bacteriófagos con el objetivo contrario, es decir, en la búsqueda de un efecto antagonista

o de resistencia cruzada. Este estudio resulta por tanto novedoso en este sentido, puesto que el objetivo es mejorar la supervivencia de las bacterias lácticas en presencia de fagos mediante el uso de bacteriocinas.

Material y métodos

Microorganismos y condiciones de cultivo

El fago sk1 se obtuvo a partir de un lisado obtenido previamente en el IPLA-CSIC (Instituto de Productos Lácteos de Asturias), realizando su propagación según se indica posteriormente en el apartado “propagación del fago sk1”. Las cepas *L. lactis* MG1363 y *L. lactis* B190 se obtuvieron a partir de cultivos congelados a -80 °C en medio de cultivo suplementado con glicerol al 50 % (v/v) y se crecieron en medio M17 líquido (Formedium, Hunstanton, Reino Unido) suplementado con glucosa al 0,5 % (p/v) (GM17). Estos cultivos líquidos se sembraron en placas de GM17 (2 % (p/v) agar) mediante el método de siembra por agotamiento. Las colonias aisladas obtenidas se emplearon en el inóculo de medio GM17, para la obtención de los cultivos empleados al inicio de los distintos experimentos, tras su incubación a 30 °C durante aproximadamente 18 horas. En el caso de la Lcn972, se empleó una preparación inicial de 25600 UA/mL en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6,8, realizando las diluciones posteriores en medio GM17. Para la nisina se empleó una solución de 100 µg/mL en ácido acético 0.05% (v/v), diluyéndola posteriormente en medio GM17. La LcnA se obtuvo a partir del sobrenadante de un cultivo de la cepa productora *L. lactis* B190 como se indica posteriormente en el apartado “obtención de LcnA” y realizando diluciones de este sobrenadante en medio GM17.

Titulación

Se empleó el protocolo de doble capa en agar, que permite observar la formación de placas de lisis (Terzaghi y Sandine, 1975). Para ello se realizaron diluciones decimales seriadas de la suspensión fágica o lisado en tampón SM (Tris-HCl 0,02 M pH 7,5, MgSO₄ 0,01 M, NaCl 0,1 M, Ca(NO₃)₂ 0,01 M). Se mezclaron 100 µl de cada dilución con 60 µl de un cultivo de *L. lactis* MG1363 y 6 mL de medio GM17 semisólido (0,7 % (p/v) agar) con Ca(NO₃)₂ y MgSO₄ 10 mM y se volcaron sobre una placa de GM17 sólido (2% (p/v) agar). Se incubaron a 30 °C hasta el día siguiente, momento en el que se contaron las placas de lisis observadas para determinar las ufp/mL.

Propagación del fago sk1

Para la propagación del fago sk1 se emplearon 2 estrategias diferentes.

- Método basado en placas de lisis. Se inoculó *L. lactis* MG1363 al 0,5 % (v/v) en 40 mL de medio GM17 con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y MgSO_4 10 mM y se incubó hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm (DO_{600}) de 0,3. Se infectó entonces con una placa de lisis previamente aislada y se dejó incubando hasta el día siguiente. A continuación, se centrifugó a 7000 rpm a 10 °C durante 15 minutos y se filtró el sobrenadante con un filtro de polietersulfona de 0,2 μm para eliminar las células.
- Método basado en suspensiones fágicas. Se inoculó *L. lactis* MG1363 al 2 % (v/v) en 40 mL de medio GM17 con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y MgSO_4 10mM y se incubó hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5. Se añadió entonces el fago, empleando distintos ratios de fago-bacteria (multiplicidad de infección, MOI): 0,03; 0,003 y 0,0003; y se dejó incubando hasta observar un descenso de la DO_{600} (3,5 horas en los dos primeros casos y hasta el día siguiente en el caso de la MOI más baja). A continuación, se centrifugó a 4000 rpm a 8 °C durante 30 minutos y se filtró el sobrenadante con un filtro de polietersulfona de 0,2 μm para eliminar las células.

Obtención de lactococcina A y determinación de su actividad

Se inocularon 50 mL de GM17 con un cultivo obtenido tras 18 horas de incubación (en GM17 con eritromicina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de *L. lactis* B190 LcnA⁺ al 2 % (v/v). Se incubó a 30 °C, midiendo la DO_{600} y sacando una pequeña alícuota (500 μL) cada hora. Estas alícuotas se centrifugaron 10 minutos a 14000 rpm a 20 °C, recuperando el sobrenadante, del que posteriormente se determinó su actividad.

Para determinar la actividad de LcnA frente a *L. lactis* MG1363 se realizó un bioensayo, empleando el método de difusión en agar. Para ello, un cultivo de 18 horas de esta cepa se diluyó 1:10 en solución salina Ringer. Con 100 μL de esta dilución se inocularon 100 mL de GM17 con agar al 1,2 % (p/v); que se repartió en 5 placas petri. En estas placas se realizaron pocillos, en los que se añadieron 20 μL de los sobrenadantes. Se analizaron todos los sobrenadantes para determinar el tiempo de mayor actividad y se realizaron diluciones en base 2 del sobrenadante obtenido tras 8 y 19,5 horas de incubación. Las placas de bioensayo se incubaron 18 horas a 30 °C, tras lo cual se midieron los halos de inhibición del crecimiento. Se define la actividad, en unidades arbitrarias de actividad

(UA), como el inverso de la dilución más alta (n) que provoca un halo de inhibición y se expresa por mL, según la siguiente relación:

$$\text{Actividad} \left(\frac{\text{UA}}{\text{mL}} \right) = \frac{2^n}{0,02\text{mL}}$$

Se representó la DO₆₀₀ respecto al tiempo, así como la actividad de la LcnA en cada momento, obteniendo así su actividad en función de la etapa de crecimiento en la que se encuentra la bacteria.

Curvas de crecimiento en diferentes condiciones

En una placa de microtitulación o microtiter se analizó el crecimiento de la cepa indicadora *L. lactis* MG1363 frente a diferentes concentraciones del fago sk1, así como frente a diferentes concentraciones de distintas bacteriocinas. Se analizó dicho comportamiento empleando 2 inóculos distintos, con el objetivo de determinar la influencia del tamaño del inóculo en el comportamiento. Para ello, cultivos en fase exponencial (DO₆₀₀ 0,3-0,5) se diluyeron con medio GM17 para ajustar a una concentración de 3×10^5 unidades formadoras de colonias (ufc) por mL o de 10^8 ufc/mL, dilución de la cual se añadieron 100 μL al pocillo, siendo por tanto la concentración final en el pocillo de la mitad.

Para el análisis del crecimiento en presencia de fago sk1 se realizaron diluciones en base 10 empleando como diluyente medio GM17 con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y MgSO_4 10 mM (en un rango entre 9×10^8 y 9×10^{-3} ufp/mL), de las que se añadieron 100 μL . Las placas se incubaron durante 16-24 horas a 30 °C, tomando medidas de DO₆₀₀ cada 15 minutos en un lector de placas microtiter (Benchmark Plus, BioRad, EEUU).

Se analizó de igual forma el comportamiento frente a las bacteriocinas, de las que se realizaron diluciones en base 2 en medio GM17, añadiendo 100 μL a cada pocillo. En el caso de la Lcn972 se emplearon concentraciones de entre 160 y 0,31 UA/mL; para la nisina se usaron concentraciones de entre 1000 y 1,95 ng/mL; y para la LcnA, de 12,5 a 0,39 UA/mL.

En ambos casos se representó la DO₆₀₀ frente al tiempo, obteniendo así la curva de crecimiento de *L. lactis* en las diferentes condiciones.

Determinación de la influencia del calcio y del magnesio en la actividad inhibitoria de las bacteriocinas frente a L. lactis MG1363

Se analizaron las MIC (concentración mínima inhibitoria) de la nisina y la Lcn972 en presencia y ausencia de calcio y magnesio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y MgSO_4 10mM), según el protocolo estándar (Qaiyumi, 2007). Un cultivo de *L. lactis* MG1363 en fase exponencial se diluyó de la forma comentada anteriormente hasta obtener una densidad celular de 3×10^5 ufc/mL. En una placa microtiter, en cada pocillo se añadieron 100 μL de este inóculo (concentración final en el pocillo de $1,5 \times 10^5$ ufc/mL) y 100 μL de la bacteriocina correspondiente a diferentes concentraciones. Se incubó durante 24 horas a 30 °C, tras lo cual se observó el crecimiento celular. Se determinó la MIC como la concentración más baja que inhibe el crecimiento (no se observa un precipitado) (Qaiyumi 2007).

Determinación de la interacción fago-bacteriocina

En una placa microtiter se analizó el crecimiento de la cepa indicadora *L. lactis* MG1363 frente a la combinación de diferentes concentraciones del fago sk1 en GM17 con calcio y magnesio (10^6 ufp/mL, 10^4 ufp/mL, 10^2 ufp/mL y 10 ufp/mL) con diferentes concentraciones de Lcn972 (10 UA/mL, 5 UA/mL, 2,5 UA/mL y 1,25 UA/mL) o nisina (62,5 ng/mL, 31,25 ng/mL, 20 ng/mL, 15,63 ng/mL y 7,81 ng/mL), en el mismo medio. Para ello, se añadió a cada pocillo 50 μL de la dilución correspondiente de fago, 50 μL de la dilución de bacteriocina y 100 μL de la cepa indicadora con una concentración de 10^8 ufc/mL (5×10^7 ufc/mL en el pocillo). Las placas se incubaron durante 24 horas a 30 °C, tomando medidas de DO_{600} cada 15 minutos, que se representaron frente al tiempo para obtener la curva de crecimiento.

Tratamiento de datos y estadística

La representación gráfica de los datos obtenidos se realizó empleando el Excel, incluido en el paquete Microsoft Office. Para analizar si las diferencias obtenidas en los experimentos con fago sk1 y Lcn972 fueron significativas se realizó un test t de Student ($\alpha=0.05$), empleando el programa estadístico R.

Resultados y discusión

Propagación del fago sk1

Con el objetivo de obtener cantidad suficiente de fago sk1 para los experimentos posteriores se realizó su propagación empleando 2 metodologías diferentes: a partir de placas de lisis previamente aisladas o a partir de fago sk1 en medio líquido empleando distintas MOIs. En ambos métodos se empleó medio GM17 suplementado con calcio y magnesio, puesto que estos iones divalentes son necesarios para la infección fágica (Mahony et al., 2015). En ambos casos se incubaron los cultivos hasta observar un descenso de la DO₆₀₀. Para determinar la eficacia de la propagación, se analizó el título obtenido mediante el protocolo de doble capa en agar.

En la titulación, tanto del stock inicial, como de los obtenidos empleando las diferentes estrategias de propagación, se obtuvieron placas de lisis claramente visibles y fáciles de cuantificar a simple vista, como se observa en la figura 4.



Figura 4. Placas de lisis formadas por el fago sk1 sobre la cepa indicadora *L. lactis* MG1363.

Como se muestra en la Tabla 2, se observó una gran diferencia entre ambos métodos, obteniendo un título más elevado mediante la segunda estrategia, basada en el uso de suspensiones fágicas. Empleando el primer método (a partir de placas de lisis) se obtuvo un título ligeramente superior al de partida (10^8 ufp/mL), mientras que mediante el segundo método se consiguió aumentar el título fágico en casi 3 órdenes de magnitud.

Tabla 2. Títulos obtenidos empleando las distintas estrategias de propagación del fago sk1 (ufp/mL)

Método	Título (ufp/mL)
1	6×10^8
2 (MOI 0,03)	$3,7 \times 10^{10}$
2 (MOI 0,003)	$4,2 \times 10^{10}$
2 (MOI 0,0003)	$7,6 \times 10^{10}$

Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por otros autores. Jarvis (1978) propagó distintos fagos empleando como hospedador distintas cepas de *L. lactis* ssp. *Lactis* y *L. lactis* ssp. *cremoris*, utilizando una MOI aproximada de 0.02 y obteniendo títulos de entre 10^8 y 10^9 ufp/mL, ligeramente inferiores a los obtenidos en este estudio. Más concretamente, Chandry et al. (1974) llevaron a cabo la propagación del mismo fago

(sk1) empleando como cepa huésped *L. lactis* ssp. *lactis* HID113, con una MOI aproximada de 0.001 y obteniendo un título final de entre 5×10^9 y 10^{10} ufp/mL, similar al obtenido en este estudio.

Se obtuvo un stock final de trabajo mediante la mezcla de las 3 muestras obtenidas empleando el método basado en las suspensiones fágicas, cuyo título fue de $1,8 \times 10^{10}$ pfu/mL, lo suficientemente elevado como para realizar los experimentos posteriores.

Obtención de LcnA

Para la obtención de LcnA y la determinación de la fase de crecimiento de producción máxima se obtuvieron muestras (sobrenadante libre de células) a distintos tiempos de incubación de la cepa productora *L. lactis* B190, siguiendo el crecimiento bacteriano.

Para cuantificar la actividad se realizaron bioensayos en placa de los sobrenadantes obtenidos a las 8 y las 19,5 horas. En el resto de las muestras, la actividad inhibitoria se estimó a partir del diámetro del halo de inhibición.

En la figura 5 se observa como la actividad de la bacteriocina comenzó a ser apreciable a las 5,5 horas de incubación, alcanzando el máximo de actividad a las 8 horas, una vez comenzada la fase estacionaria, lo cual concuerda con lo esperable y observado en la producción de otras bacteriocinas producidas por BAL, que son producidas durante el crecimiento (De Vuyst y Vandamme, 1992). Debido a los pocos datos obtenidos durante la fase exponencial, no puede obtenerse ninguna información sobre la proporcionalidad entre el crecimiento y la actividad de la LcnA; sin embargo, cabría esperar, al igual que ocurre en la producción de nisina, que la actividad aumente proporcionalmente con el crecimiento bacteriano, alcanzando el máximo al final de la fase exponencial.

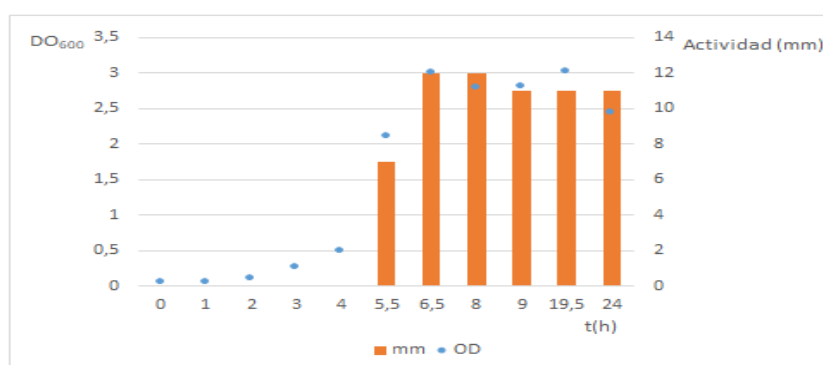


Figura 5. Producción de lactococina A en *L. lactis* B190 a lo largo de la curva de crecimiento en GMI7.

En el bioensayo realizado con el objetivo de cuantificar la actividad de la LcnA, se obtuvo el mismo resultado en el sobrenadante obtenido tras 8 horas de incubación que en el sobrenadante obtenido tras 19,5 horas. La dilución 0 fue la única en la que se observó un halo de inhibición, siendo por tanto la actividad de:

$$\frac{2^0}{0,02mL} = 50 \text{ UA/mL}$$

Finalmente, se tomó como stock el sobrenadante obtenido a las 8 horas (50 UA/mL). A priori, parece una actividad relativamente baja, por lo que podría resultar interesante realizar una purificación o concentración del sobrenadante obtenido. Sin embargo, se decidió no realizar dicha concentración y comprobar previamente si esta actividad es suficiente de cara a los ensayos posteriores.

Crecimiento de L. lactis MG1363 en presencia del fago sk1

Con el objetivo de estudiar la influencia del inóculo inicial, así como de establecer un rango de concentraciones de fago apropiado de cara a los experimentos posteriores, se realizaron experimentos empleando 2 inóculos iniciales diferentes: 1.5×10^5 ufc/mL y 5×10^7 ufc/mL. Frente a ambos, se emplearon distintas concentraciones de fago sk1. Se realizaron 2 replicados biológicos en cada caso, obteniendo resultados muy similares en los 2 replicados.

Tanto empleando un inóculo inicial pequeño, como empleando el inóculo más grande, se observaron variaciones en la curva de crecimiento en función de la concentración de fago sk1 empleada. Puesto que los principales parámetros implicados en la cinética de la infección fágica son la concentración de bacteria huésped, la concentración de fago y la afinidad de este por su huésped, el principal parámetro en este caso es la concentración fágica (Hagens y Loessner, 2010).

En la figura 6A se muestran las curvas de crecimiento representativas obtenidas empleando el inóculo inicial más bajo (1.5×10^5 ufc/mL), que engloba MOIs entre 60 y 6×10^{-8} . En ella puede observarse como, en el caso del control positivo (solo bacteria), así como en aquellos casos en los que hay crecimiento, la fase exponencial comenzó tras 8 horas de incubación. En el caso de los cultivos en presencia de fago sk1, mientras que las concentraciones más bajas permitieron el crecimiento normal de la bacteria, en presencia de concentraciones fágicas de 90 ufp/mL y 9 ufp/mL la bacteria se lisó casi al comienzo de la fase exponencial. Concentraciones superiores de fago sk1 inhibieron totalmente el

crecimiento celular. Así, una MOI de 6×10^{-5} (correspondiente a una concentración fágica de 9 ufp/mL) es la MOI más pequeña que impidió el crecimiento normal bacteriano.

En la figura 6B se representan las curvas representativas obtenidas empleando el inóculo inicial más alto (5×10^7 ufc/mL). En ella puede observarse como en los casos en los que se produjo un crecimiento, la fase exponencial fue inmediata, no existiendo una fase de latencia. Concentraciones superiores a 10^8 ufp/mL no permitieron el crecimiento celular, mientras que con concentraciones inferiores a 0,9 ufp/mL se observó un crecimiento similar al cultivo control sin infectar. A concentraciones intermedias se observó una relación entre la concentración de fago y el tiempo en el que se produjo la lisis celular, así como la DO_{600} máxima que se alcanzó antes de lisis. Cuanto mayor fue la concentración de fago sk1 empleada, antes se produjo la lisis bacteriana y se alcanzó una menor DO_{600} antes de dicha lisis. Se determinó una MOI de $1,8 \times 10^{-6}$ (90 ufp/mL) como la MOI más baja que impidió el crecimiento normal. Cabe destacar la diferencia observada cuando se empleó una concentración de fago sk1 de 9 ufp/mL entre los 2 duplicados, observándose en un caso un crecimiento normal (igual al control positivo) (resultados no mostrados) y en el otro, una lisis celular justo antes de alcanzar la fase estacionaria como se observa en la figura 6B. Se observó además que, transcurridas unas 8 horas tras la lisis celular, se inició un crecimiento exponencial, debido probablemente a la selección de bacterias resistentes al fago, tratándose de una recuperación bastante rápida. Este crecimiento guarda relación con la lisis celular, cuanto antes se produce esta, antes y de forma más notable se produce la recuperación.

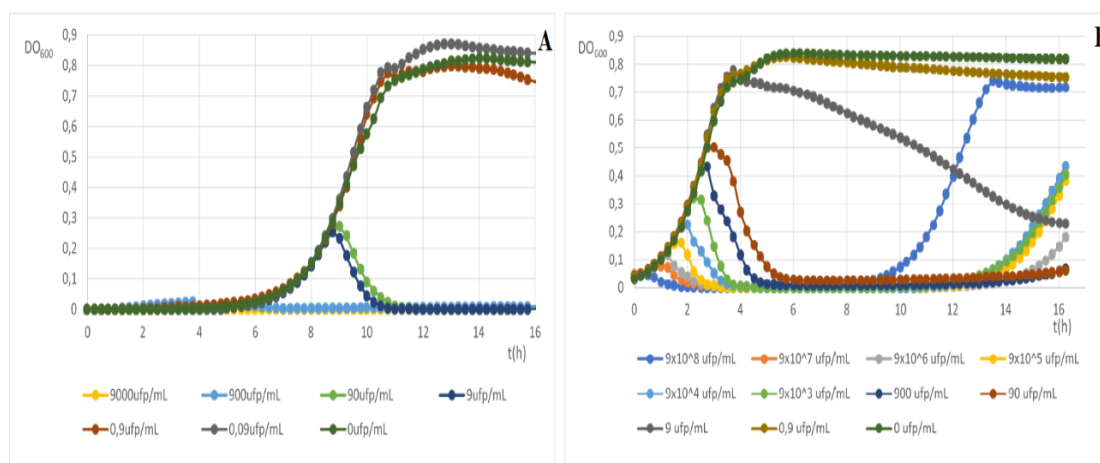


Figura 6. Curvas representativas de cultivos de *L. lactis* MG1363 en presencia de distintas concentraciones de fago sk1. A: inóculo inicial $1,5 \times 10^5$ ufc/ml. B: inóculo inicial 5×10^7 ufc/ml. Cultivos realizados a 30 °C en GM17 suplementado con Ca^{2+} y Mg^{2+} 10 mM.

Cabe destacar que la MOI más baja que impide el crecimiento normal bacteriano fue inferior empleando un inóculo inicial elevado que empleando un inóculo inicial más bajo. Esta influencia del inóculo inicial se hace más notable si se comparan MOIs similares con los distintos inóculos. Con una MOI del orden de 10^{-6} , mientras que en el caso de un inóculo inicial bajo se produjo un crecimiento igual al control positivo, en el caso de un inóculo inicial elevado, se produjo la lisis celular. Lo mismo ocurrió con una MOI del orden de 10^{-7} , que permitió el crecimiento normal en el caso de una densidad celular inicial baja, pero en ocasiones provocó lisis en el caso de una densidad celular inicial alta. Este hecho concuerda con lo observado anteriormente por otros autores. Dada la gran capacidad de amplificación de los bacteriófagos, cuando la concentración bacteriana es elevada, incluso una pequeña concentración inicial de fago puede provocar la lisis total del cultivo en un tiempo relativamente corto. Por el contrario, cuando se trata de un inóculo pequeño, es necesaria una mayor concentración fágica, puesto que la probabilidad de encuentro entre la bacteria y el fago, dado su pequeño tamaño, es menor (Bigwood et al., 2009; Hagens y Loessner, 2010). Algunos autores establecen el límite, en términos del estudio de la interacción con fagos, en una concentración bacteriana de 10^4 - 10^5 ufc/mL, por debajo de la cual se habla de baja densidad celular, mientras que concentraciones superiores se consideran una elevada densidad celular (Kasman et al., 2002). Teniendo en cuenta esto, el efecto del tamaño del inóculo en la infección fágica sería más evidente si se hubiera empleado un inóculo aún más pequeño que el utilizado en este estudio (1.5×10^5 ufc/mL).

Crecimiento de L. lactis MG1363 en presencia de Lcn972

Al igual que en el caso del fago, se analizó el comportamiento bacteriano en función de distintas concentraciones de bacteriocina y de 2 inóculos iniciales diferentes (1.5×10^5 ufc/mL y 5×10^7 ufc/mL) con el objetivo de determinar un rango de concentración adecuado para los experimentos posteriores, así como de determinar la influencia del inóculo inicial. Al igual que en el caso anterior se realizaron 2 duplicados biológicos en cada caso, obteniendo iguales resultados en ambos duplicados.

En la figura 7A se representan las curvas representativas del cultivo realizado empleando una densidad celular inicial de $1,5 \times 10^5$ ufc/mL. En ella se observa que la presencia de bacteriocina retrasó el crecimiento incluso en las concentraciones más bajas. Se observó una mayor fase de latencia proporcional a la concentración de la bacteriocina. Se observó, además, que la bacteriocina retrasó el crecimiento sin provocar lisis, como ya se había

descrito previamente (Martínez et al., 2000). En concentraciones superiores a 2,5 UA/mL se inhibió totalmente el crecimiento, por lo que este valor corresponde a la MIC de esta bacteriocina en estas condiciones.

En la figura 7B se representan las curvas obtenidas con una densidad celular inicial de 5×10^7 ufc/mL. En ella se observa que la presencia de bacteriocina retrasó el crecimiento sin provocar lisis, al igual que ocurría en el caso anterior, inhibiéndolo totalmente con concentraciones superiores a 40 UA/mL, siendo esta, por tanto, la MIC.

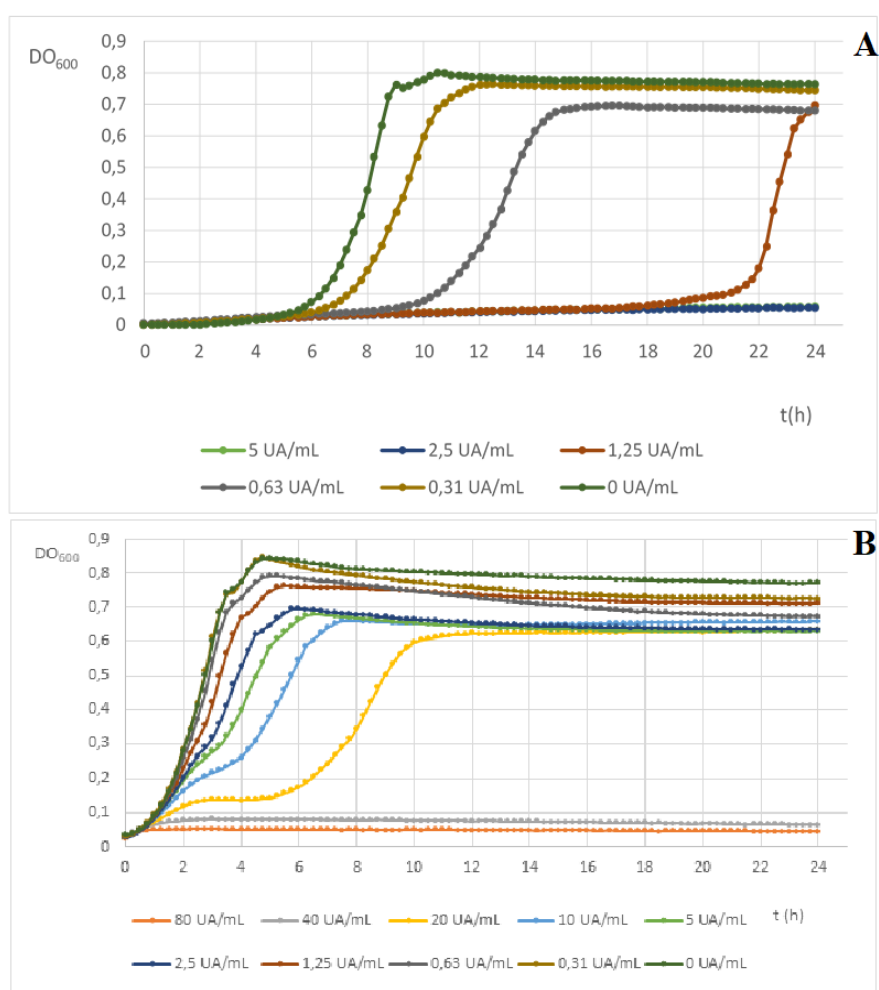


Figura 7. Curvas representativas de cultivos de *L. lactis* MG1363 en presencia de distintas concentraciones de fago Lcn972. A: inóculo inicial $1,5 \times 10^5$ ufc/ml. B: inóculo inicial 5×10^7 ufc/ml. Cultivos realizados a 30 °C en GM17.

Cabe destacar la gran diferencia entre las MICs obtenidas empleando los diferentes inóculos, siendo mayor en el caso del inóculo de mayor densidad celular, algo ya observado anteriormente por otros autores y que se debe a que es necesaria una mayor cantidad de antimicrobiano, Lcn972 en este caso, para inhibir el crecimiento de una mayor carga microbiana (Bidlas et al., 2008). Se ha observado además que la duración de la fase

de latencia guarda relación con el tamaño del inóculo, siendo esta fase mayor en el caso de densidades celulares más bajas; por lo que esta diferencia en las MICs está también relacionada con el tiempo que tarda un determinado inóculo en lograr crecer en las condiciones ambientales dadas. Es necesario recalcar además que las MICs determinadas son las correspondientes a la Lcn972 en las condiciones concretas empleadas en este trabajo, puesto que diferentes estudios demuestran que este parámetro se ve afectado por las condiciones experimentales, especialmente por el tamaño del inóculo, el tiempo y la temperatura de incubación, o el medio de cultivo empleado. En el estudio realizado por Egervärn et al. (2007) empleando distintos antibióticos frente a varias cepas de BAL se observó que la MIC aumenta con el tamaño del inóculo, así como con el tiempo de incubación, estableciendo las condiciones óptimas de determinación de la MIC en una densidad celular inicial de 3×10^5 ufc/mL y un tiempo de incubación de 48 horas (siendo observable también a las 24 horas).

Crecimiento de L. lactis MG1363 en presencia de nisina

Se analizó de igual forma el crecimiento bacteriano en presencia de distintas concentraciones de nisina empleando 2 inóculos iniciales diferentes (1.5×10^5 ufc/mL y 5×10^7 ufc/mL), con el mismo objetivo anterior: determinar un rango de concentraciones de trabajo apropiado, así como estudiar la influencia del tamaño del inóculo inicial. Se realizaron 2 replicados biológicos en cada caso, obteniendo resultados similares en ambos duplicados.

En la figura 8A puede observarse como, con una densidad celular inicial baja (1.5×10^5 ufc/mL), la presencia de nisina retrasó el crecimiento celular, inhibiéndolo totalmente a concentraciones superiores a 62,5 ng/mL, determinando así la MIC en estas condiciones. Como era esperable y al igual que en el caso de la Lcn972, la presencia de nisina retrasó el crecimiento sin provocar lisis bacteriana, como ya había sido determinado previamente por otros autores (Galván-Márquez et al., 2020).

En la figura 8B se observa que, con una densidad celular inicial elevada, el efecto de la nisina es el mismo: retrasa el crecimiento de *L. lactis* MG1363 sin provocar su lisis, siendo en este caso la MIC igual a 125 ng/mL.

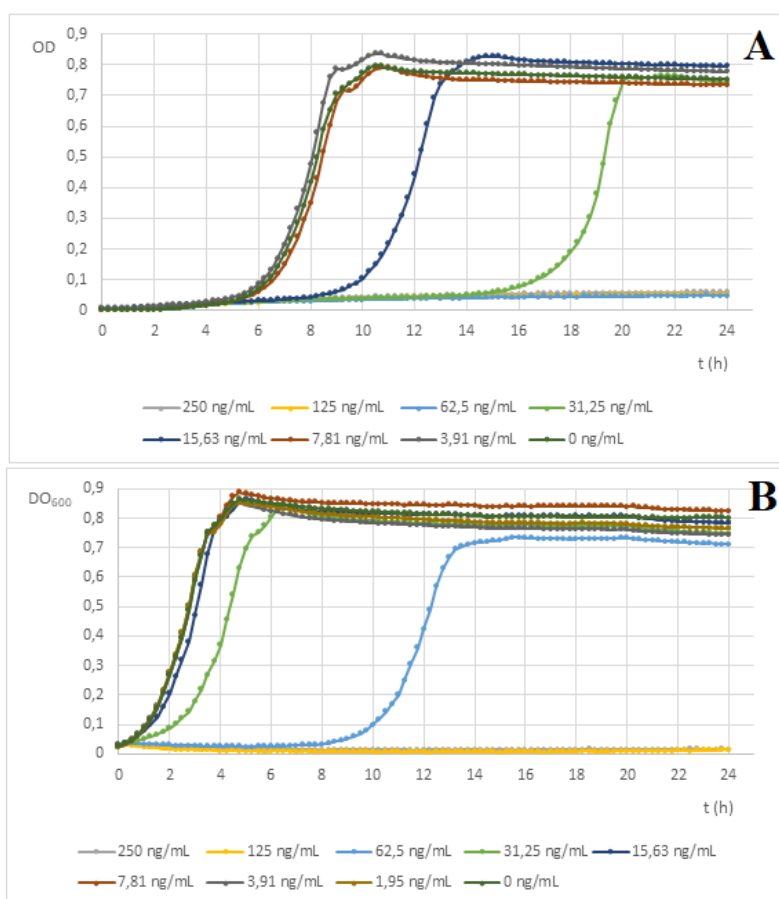


Figura 8. Curvas representativas de cultivos de *L. lactis* MG1363 en presencia de distintas concentraciones de nisina. A: inóculo inicial $1,5 \times 10^5$ ufc/ml. B: inóculo inicial 5×10^7 ufc/ml. Cultivos realizados a 30 °C en GM17.

Al igual que en el caso de la Lcn972 y de otros antibióticos previamente estudiados, se observa que la MIC es superior al emplear un inóculo de mayor tamaño, efecto ya explicado en el apartado anterior. Sin embargo, en este caso la dependencia del tamaño del inóculo inicial es menor, la diferencia en la MIC entre los 2 inóculos es de apenas un orden de magnitud.

Crecimiento de L. lactis MG1363 en presencia de LcnA

Ante la aparentemente baja actividad de la LcnA obtenida, se planteó la necesidad de determinar si esta actividad era suficiente de cara a los experimentos posteriores o era necesario realizar una concentración o purificación posterior. Para ello, se analizó el crecimiento bacteriano en presencia de distintas concentraciones de LcnA, empleando un inóculo inicial de 5×10^7 ufc/mL. Se realizaron 2 replicados biológicos, en los que se obtuvieron resultados similares. Sin embargo, en uno de ellos se observó crecimiento en el control negativo (medio de cultivo + bacteriocina), por lo que sería necesario repetir el

experimento, algo que no resultó posible dadas las circunstancias derivadas de la crisis causada por el virus SARS-cov-2. Por ello, aunque se presentan los resultados obtenidos, deben ser tomados con mucha cautela, siendo imprescindible repetir el experimento para poder tenerlos en cuenta. Por todo ello, los experimentos posteriores con esta bacteriocina no pudieron ser llevados a cabo.

En cualquier caso, en la figura 9 puede verse que la presencia de LcnA ralentizó el crecimiento incluso a bajas concentraciones. Al igual que en los casos anteriores se produjo un retraso del crecimiento, sin la presencia la lisis bacteriana, lo que coincide con los estudios previos (Holo et al., 1991). Se podría considerar que la MIC es superior a 12,5 UA/mL, puesto que esta concentración no permitió alcanzar la DO₆₀₀ máxima normal, aunque sí permitió cierto crecimiento. Pese a no tener actividad suficiente para alcanzar la MIC en estas condiciones, se observó una actividad inhibitoria suficiente para poder emplear el sobrenadante sin necesidad de purificar la bacteriocina previamente.

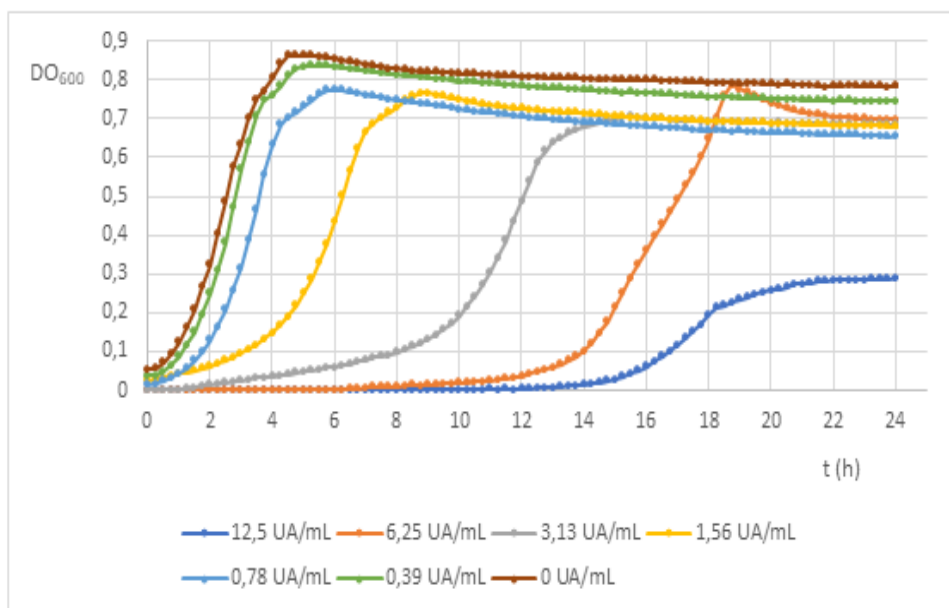


Figura 9. Curvas representativas de cultivos de *L. lactis* MG1363 en presencia de distintas concentraciones de LcnA empleando un inóculo inicial de 5×10^7 ufc/ml. Cultivos realizados a 30 °C en GM17.

Teniendo en cuenta el crecimiento en el control negativo, se planteó la necesidad de realizar una filtración adicional de este sobrenadante con el objetivo de eliminar las células no eliminadas previamente, que podrían ser causa de la contaminación observada.

Influencia del calcio en la actividad inhibitoria de la Lcn972 y la nisina frente a L. lactis MG1363

Mientras que los experimentos en los que se evaluó el crecimiento de *L. lactis* MG1363 en presencia de bacteriocina se realizaron sin calcio ni magnesio, la presencia de iones divalentes como el calcio o el magnesio es necesaria para que la infección por el fago sk1 sea eficiente (Mahony et al., 2015). Por ello, antes de proceder a estudiar el uso combinado de las distintas bacteriocinas y el fago sk1, se procedió a determinar si había variaciones en las MICs en presencia y ausencia de estos iones. Cada MIC se determinó por duplicado, obteniendo idénticos resultados en ambos.

La tabla 3 muestra los valores obtenidos en la determinación de la MIC en estas condiciones experimentales. En el caso de la Lcn972 no se observaron diferencias, mientras que en el caso de la nisina se observó un ligero aumento de la MIC (disminución de la actividad) en presencia de calcio. Esta diferencia es de una única dilución y podría deberse al error experimental, puesto que estudios previos determinan que la afinidad por el lípido II y, consecuentemente, la actividad formadora de poros de la nisina es independiente de la presencia, al menos, de calcio. Sin embargo, no podemos descartar que exista una posible interferencia en las interacciones electrostáticas iniciales a las concentraciones de iones ensayadas (10 mM), ya que son muy superiores a las utilizadas en los mencionados estudios de 1.25 mM (Böttiger et al., 2009).

Tabla 3. MICs de nisina y Lcn972 frente a L. lactis MG1363 en presencia y ausencia de calcio y magnesio en GM17.

	MIC en presencia de Ca	MIC en ausencia de Ca
Lcn972	2,5 UA/mL	2,5 UA/mL
Nisina	125 ng/mL	62,5 ng/mL

Efecto combinado de la bacteriocina Lcn972 y el fago sk1 en el crecimiento de L. lactis MG1363

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente, en los que se observa un amplio margen de concentraciones subinhibitorias de Lcn972 que permiten el crecimiento de *L. lactis* MG1363, es factible el estudio de la interacción entre el fago sk1 y la Lcn972 en relación al crecimiento bacteriano.

Para ello, se decidió emplear únicamente el inóculo inicial de 5×10^7 ufc/mL, que se corresponde con las condiciones de una fermentación láctea. Se emplearon distintas concentraciones de fago sk1 y distintas concentraciones de Lcn972, seleccionando en el caso del fago 4 concentraciones susceptibles de causar problemas en una fermentación real y en el caso de la Lcn972, concentraciones subinhibitorias. Se realizaron 2 duplicados biológicos, en los que se obtuvieron resultados muy similares.

En la figura 10 se muestra una recopilación de las curvas de crecimiento de *L. lactis* MG1363 en presencia del fago sk1 y Lcn972 simultáneamente. En cada gráfico se representan las curvas de crecimiento en presencia de una determinada concentración de fago sk1 con diferentes concentraciones de Lcn972. En ellas se observa que la presencia de bacteriocina tuvo un efecto sinérgico con el bacteriófago, favoreciendo la lisis bacteriana provocada por el fago en las fases iniciales. En las fases finales, por el contrario, en las concentraciones de fago más bajas (100 ufp/mL y 10 ufp/mL), la presencia de bacteriocina parece favorecer la recuperación de los cultivos. Estas observaciones coinciden con las realizadas por otros autores. Es el caso del estudio realizado por Martínez et al. (2008), en el que se estudió el efecto de la combinación de los fagos $\phi 35$ y $\phi 88$ con nisina en el crecimiento de *S. aureus* en leche, observando un efecto sinérgico en las fases iniciales. Sin embargo, transcurrido un tiempo de incubación largo, el desarrollo de células adaptadas a la nisina disminuyó la infectividad fágica, estableciéndose una correlación entre la resistencia a la nisina y a los fagos. De igual forma, en la combinación de la coagulina C23 con un fago de *Listeria* en leche se observó también un efecto sinérgico, permitiendo la reducción de las células viables hasta niveles no detectables; aunque en este trabajo no se realizó un análisis de las fases posteriores. (Rodríguez-Rubio et al., 2015).

Cabe destacar que, pese a que los estudios que incluyen una combinación de bacteriófago-bacteriocina/antibiótico son bastante habituales, en general el objetivo de esta combinación es favorecer la eliminación de una bacteria patógena. Este estudio resulta novedoso, puesto que busca el efecto contrario, disminuir el efecto del fago sobre la bacteria. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la hipótesis inicial basada en el uso de Lcn972 para disminuir la incidencia del fago en las fermentaciones lácteas tiene posibilidades de éxito, aunque no basándose en el uso combinado al inicio de la fermentación, sino basándose en el hecho de que parece permitir una recuperación más

rápida. Sería posible pensar, por tanto, que una preadaptación a la Lcn972 podría favorecer la resistencia al fago sk1.

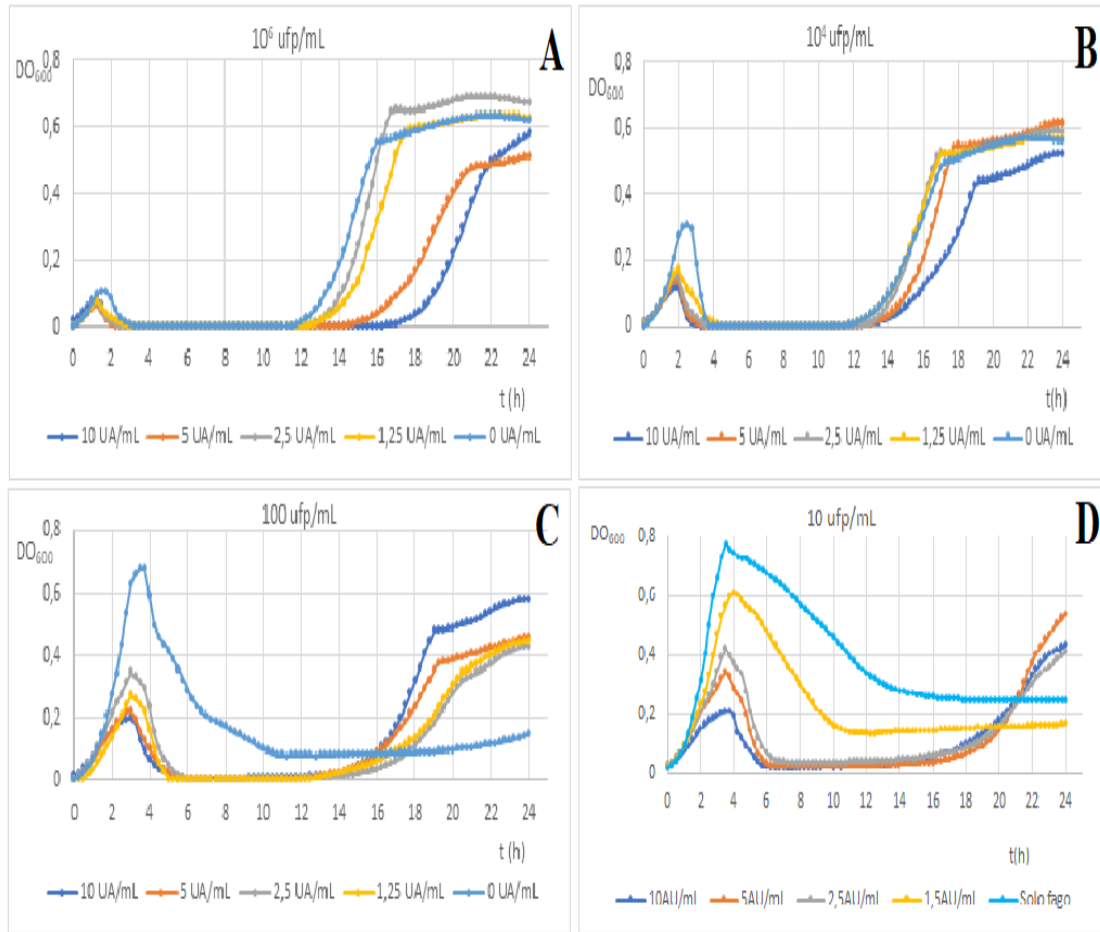


Figura 10. Curvas representativas del crecimiento de *L.lactis* MG1363 en presencia de fago sk1 y Lcn972 con una densidad celular inicial de 5×10^7 ufc/mL. En la gráfica A se emplea una concentración de fago de 10^6 ufp/mL y diferentes concentraciones de Lcn972; en la B, 10^4 ufp/mL; en la C, 10^2 ufp/mL y en la D, 10 ufp/mL. Cultivos realizados a 30 °C en medio GM17 suplementado con calcio y magnesio.

La figura 11 muestra los resultados de un análisis más en detalle de la fase inicial de la infección fágica, representando la DO₆₀₀ máxima alcanzada antes del inicio de la lisis del cultivo bacteriano. Se observa que la presencia de bacteriocina provocó que la DO₆₀₀ alcanzada fuera menor, al retrasar el crecimiento bacteriano. Este efecto se observó más claramente en las concentraciones de fago intermedias (10^4 ufp/mL y 10^2 ufp/mL), siendo las diferencias respecto a la infección en ausencia de bacteriocina estadísticamente significativas ($p < 0.05$) únicamente en el caso de una concentración de fago sk1 de 100 ufp/mL junto a las concentraciones más elevadas de Lcn972 (2.5, 5 y 10 UA/mL) y en el caso de 10^6 ufp/mL junto a 5 UA/mL. Para la concentración de fago sk1 de 10 ufp/mL no se realizó este tipo de representación puesto que se trata de un valor para el que los resultados obtenidos son diferentes en cada duplicado, produciéndose la lisis como se

muestra en la figura 10D o teniendo lugar un crecimiento normal (resultados no mostrados), por lo que no es posible determinar en todos los casos la DO_{600} de lisis. En cualquier caso, cuando se produce la lisis, esta se ve claramente acelerada en presencia de Lcn972, siendo la DO_{600} alcanzada antes de lisis menor, como puede verse en la figura 10D.

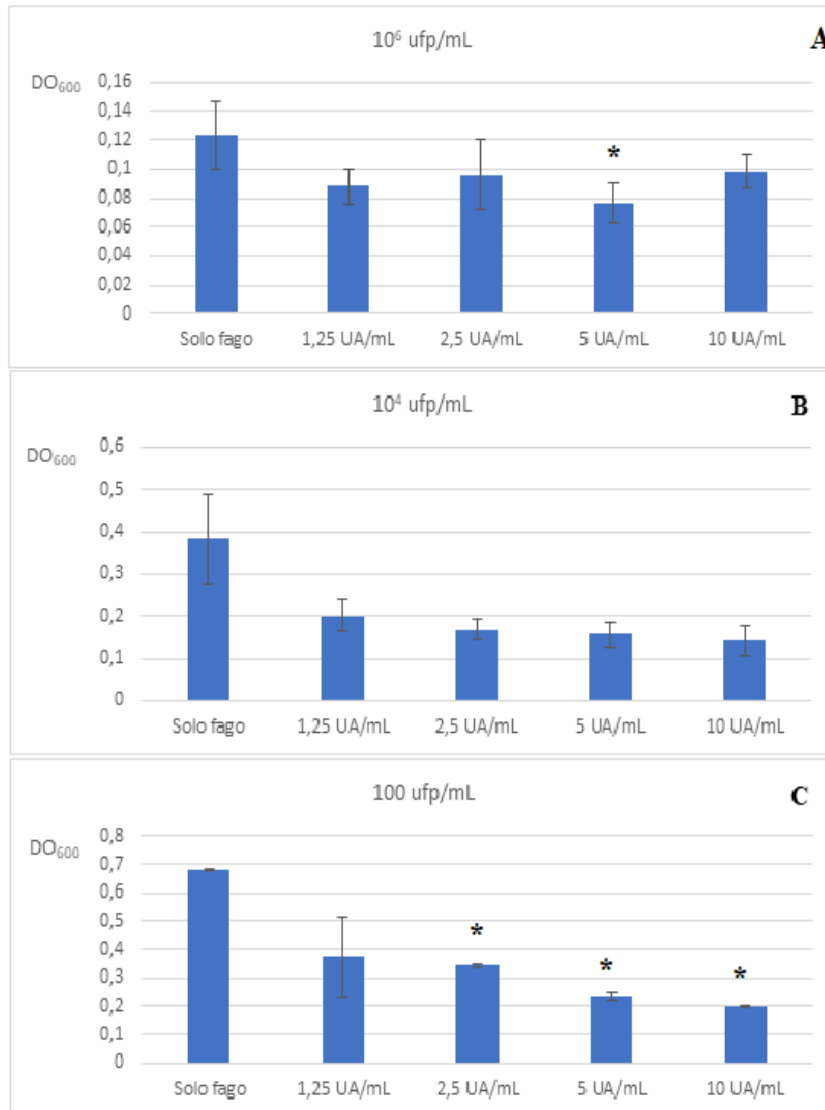


Figura 11. DO_{600} máxima previa a la lisis de *L. lactis* MG1363 infectada con el fago *skI* en presencia de Lcn972. Cada gráfica muestra una concentración de fago (A: 10^6 ufp/mL; B: 10^4 ufp/mL; C: 100 ufp/mL) frente a distintas concentraciones de Lcn972. *: diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

En la figura 12 se representa la DO_{600} tras 24 horas de incubación. En esta figura puede observarse como esta DO_{600} es mayor en presencia de bacteriocina en el caso de una concentración fágica de 100 ufp/mL, siendo las diferencias estadísticamente significativas en el caso de concentraciones de Lcn972 de 2.5, 5 y 10 UA/mL. De nuevo,

en el caso de la concentración fágica más pequeña (10 ufp/mL) se observan grandes variaciones en función de si se produce lisis o no, por lo que no se realizó este tipo de representación. En cualquier caso, cuando se produce dicha lisis, la DO₆₀₀ tras 24 horas es claramente superior en presencia de bacteriocina, como se observa en la figura 10D.

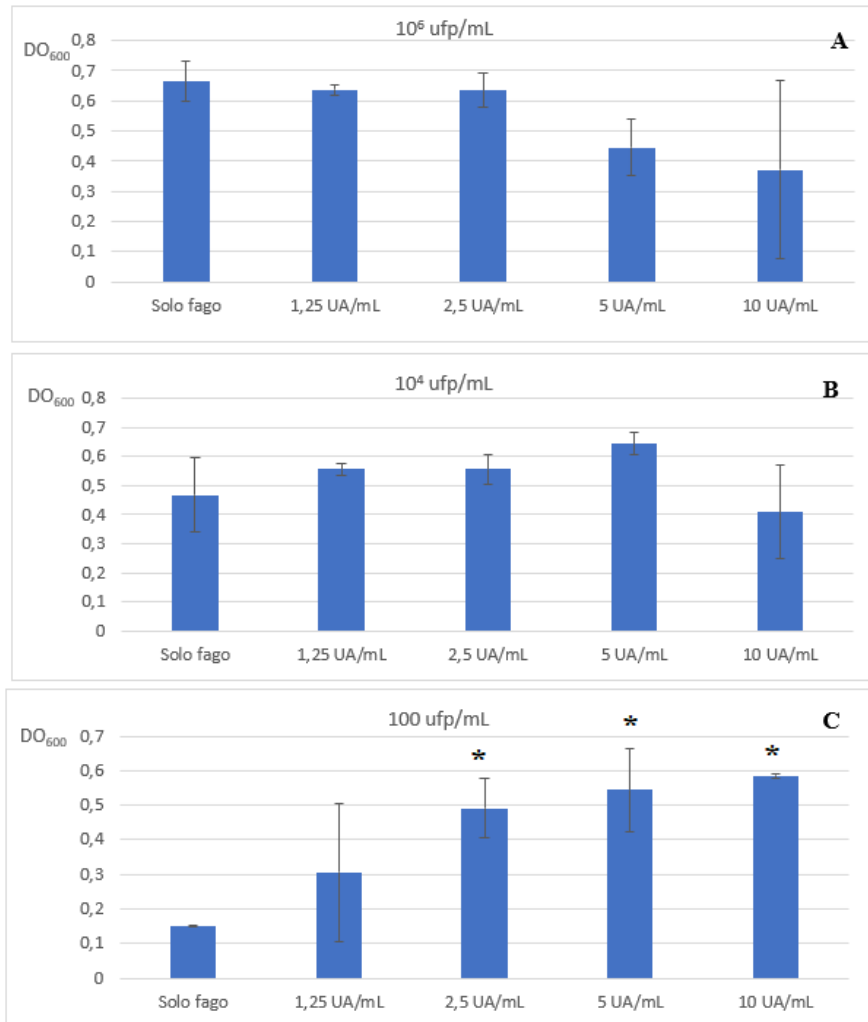


Figura 12. Representación de la DO₆₀₀ tras 24 horas de incubación. Cada gráfica muestra una concentración de fago frente a distintas concentraciones de Lcn972. En la A se emplea 10⁶ ufp/mL; en la B, 10⁴ ufp/mL y en la C, 100 ufp/mL. *: diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Esta mayor recuperación del cultivo podría explicarse mediante 2 hipótesis diferentes. Por una parte, al verse acelerada la lisis celular, los viriones formados podrían ser menos, puesto que el tiempo transcurrido desde el inicio de la infección fágica hasta la lisis sería menor, viéndose, por tanto, reducido el tiempo para la replicación del genoma vírico y el empaquetamiento de este para la formación de viriones completos. Teniendo en cuenta esto, la proporción de células bacterianas no infectadas sería mayor, por lo que la

recuperación posterior del cultivo se vería favorecida. Cabría realizar un análisis de la curva de un solo paso del fago sk1 en presencia y ausencia de bacteriocina. Este experimento permitiría determinar varios parámetros de la cinética de la infección fágica y, en concreto, el tamaño de explosión (número de viriones liberados) (Kropinski, 2018). Además, si esta hipótesis se confirmara, el hecho de que las células estén expuestas a una menor concentración de viriones podría hacer que la presión selectiva sea menor y, por tanto, que las células que sobreviven a la infección no tienen que ser necesariamente resistentes al fago sk1. Por esta razón, sería necesario confirmar la frecuencia de resistentes al fago sk1 en los cultivos de 24 h.

Por otra parte, la mayor recuperación podría deberse a una mayor disponibilidad de nutrientes que favorezca el rápido crecimiento de mutantes resistentes al fago sk1. Puesto que el crecimiento que tiene lugar antes de que se produzca la lisis en presencia de bacteriocina es menor, existe un menor consumo de nutrientes por parte de las células susceptibles, quedando, por tanto, una mayor cantidad disponible para el crecimiento posterior.

De cara a confirmar y desarrollar en mayor profundidad estas hipótesis, sería interesante, por tanto, conocer la proporción de células sensibles y resistentes tanto al fago sk1 como a la bacteriocina Lcn972 en aquellos cultivos que continúan su crecimiento.

Efecto combinado de la nisina y el fago sk1 en el crecimiento de L. lactis MG1363

En los experimentos realizados con nisina se observó que el margen de concentraciones que permiten o inhiben por completo el crecimiento de *L. lactis* MG1363 era menor que en el caso de Lcn972. En cualquier caso, se ensayaron 5 concentraciones incluyendo aquellas que no afectaban al crecimiento bacteriano, al menos de forma evidente, para el estudio del efecto combinado del fago sk1 y la nisina. Al igual que en el caso de la Lcn972, se decidió emplear únicamente el inóculo inicial de 5×10^7 ufc/mL, correspondiente a las condiciones de una fermentación y 4 concentraciones de fago. Debido a la crisis provocada por virus SARS-cov2, se realizó únicamente una repetición, por lo que, pese a que se incluyen los resultados obtenidos, es necesario tomarlos con cautela y realizar el duplicado correspondiente antes de llegar a ninguna conclusión definitiva.

En la figura 13 se representa el crecimiento bacteriano en presencia de diferentes concentraciones de fago sk1 y nisina. En presencia de 10^4 ufp/mL (figura 13B) y de 10^2 ufp/mL (figura 13C) la presencia de nisina favorece ligeramente la lisis celular, aunque este efecto es mucho menos evidente que con Lcn972 (ver figura 10). Sin embargo, en el caso de la concentración de fago más elevada (10^6 ufp/mL) (figura 13A), la presencia de nisina retrasa la lisis celular. Por último, en el caso de una concentración fágica de 10 ufp/mL (figura 13D) las concentraciones más elevadas de nisina (62.5 y 31,25 ng/mL) inhibieron por completo la lisis bacteriana. Por el contrario, en presencia de 20, 15,63 y 7,81 ng/mL se observó que el crecimiento previo a la lisis bacteriana fue similar al cultivo solamente con fago. La variabilidad observada en los experimentos anteriores (cultivos en presencia de fago sk1 y cultivos en presencia de fago sk1 y Lcn972) con esta concentración fágica hace que la realización del replicado biológico cobre más importancia aún si cabe. Puesto que en presencia de 10 ufp/mL en ocasiones se produce la lisis bacteriana y en ocasiones el crecimiento es similar al control positivo, resulta poco fiable la predicción del comportamiento de *L. lactis* MG1363 en presencia de nisina y una concentración de fago sk1 de 10 ufp/mL.

Respecto al crecimiento bacteriano posterior a la lisis, al igual que lo observado anteriormente con la bacteriocina Lcn972, la presencia de nisina parece favorecer la recuperación posterior de los cultivos. Un comportamiento que ya fue observado por otros autores al combinar nisina con los fagos $\phi 35$ y $\phi 88$ de *S. aureus* (Martínez et al., 2008). En dicho estudio se observó que la resistencia cruzada entre estos fagos y la nisina se debía a cambios en la superficie bacteriana que implicaban una reducción de su carga negativa y una mayor hidrofobicidad. A la espera de confirmar lo que ocurre en *L. lactis* y la combinación de fago sk1-nisina, es factible que ocurra algo similar y que se modifiquen o alteren las interacciones iniciales fago-bacteria necesarias para que se inicie la infección.

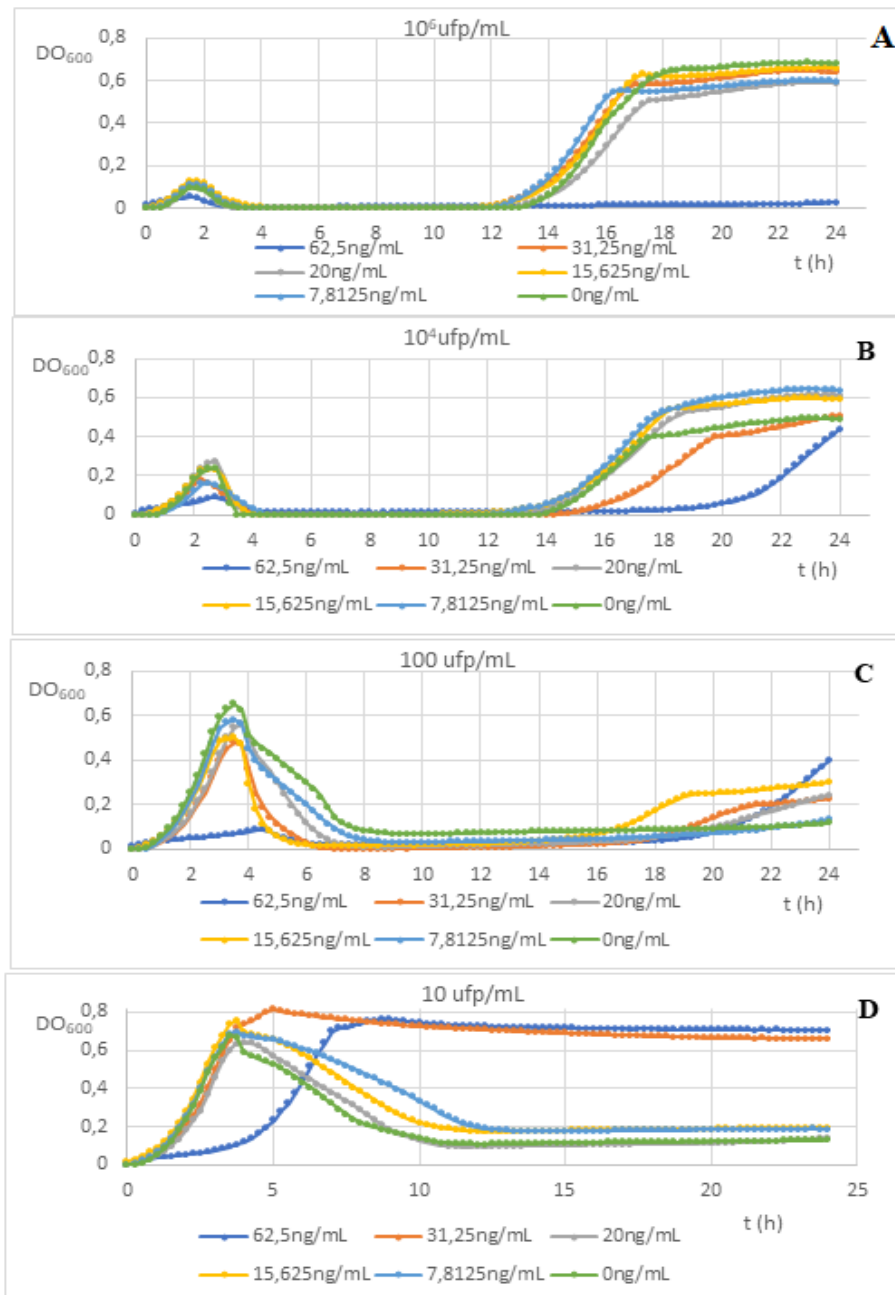


Figura 13. Curvas representativas del crecimiento de *L.lactis* MG1363 en presencia de fago y nisina con una densidad celular inicial de 5×10^7 ufc/mL. En la gráfica A se emplea una concentración de fago de 10^6 ufp/mL y diferentes concentraciones de nisina; en la B, 10^4 ufp/mL; en la C, 10^2 ufp/mL y en la D, 10 ufp/mL. Cultivos a 30°C en medio GMI7 suplementado con calcio y magnesio.

Perspectivas futuras

Debido a las circunstancias en las que se desarrolló este trabajo, la disponibilidad de tiempo y equipos para la realización de experimentos fue muy limitada y, por tanto, parte de ellos no pudieron ser realizados. Se presenta en esta sección el diseño de los experimentos pendientes y su justificación.

Correlación del modo de acción de distintas bacteriocinas y la infección por el fago sk1

Con el objetivo de determinar si el modo de acción de las bacteriocinas influye en la infectividad del fago sk1, deberíamos comparar los resultados obtenidos con las 3 bacteriocinas.

Para ello, tras la filtración del sobrenadante de LcnA mediante un filtro de 0,2 μm y la determinación de su actividad, se realizarán los experimentos en combinación con el fago sk1 siguiendo el mismo protocolo empleado para el resto de bacteriocinas.

Se trata de 3 bacteriocinas cuyo modo de acción es completamente diferente, mientras que la Lcn972 afecta únicamente a la síntesis de peptidoglicano, la LcnA únicamente forma poros y la nisina tiene ambos modos de acción. Por ello, si la interferencia de las bacteriocinas con el ciclo infectivo del fago depende de su modo de acción, podrían apreciarse diferencias en la cinética de la infección reflejada en las curvas de crecimiento en presencia de dichas bacteriocinas. Es decir, si un modo de acción concreto se mostrase más eficaz de cara a la mejora de la supervivencia de *L. lactis* en presencia de fago sk1, abriría las puertas a la búsqueda de nuevas estrategias empleando otras bacteriocinas con igual modo de acción.

Curva de crecimiento de un solo paso del fago sk1

Una de las hipótesis formuladas en respuesta al hecho de que se produzca una mayor recuperación de los cultivos de *L. lactis* MG1363 con fago sk1 en presencia de Lcn972 que en ausencia de bacteriocina se basa en la posibilidad de que el número de viriones formados sea menor. Existen, sin embargo, estudios que contradicen esta hipótesis, como el caso de Ryan et al. (2012) en el que se analizó el denominado efecto sinérgico fago-antibiótico entre el fago T4 y el antibiótico cefalotaxima frente a *E. coli*, observando que la presencia de cefalotaxima reduce el tiempo de latencia y el tiempo de lisis, a la par que aumenta el tamaño de explosión. Para comprobar si dicha hipótesis es correcta o el comportamiento se asemeja al obtenido en estudios previos de otros autores, se analizará la curva de crecimiento de un solo paso del fago sk1 en presencia y ausencia de Lcn972.

La curva de crecimiento de un solo paso permite determinar el periodo de latencia y el tamaño de explosión de un bacteriófago; es decir, permite determinar el periodo en el cual no se detectan viriones en el exterior y el número de viriones completos formados en cada ciclo por célula infectada. Proporciona además información interesante como la tasa de adsorción o la duración del periodo de aumento del número de fagos (desde el momento

en que empiezan a detectarse viriones en el exterior, hasta que el número de viriones deja de aumentar), en un solo ciclo (Kropinski, 2018).

Para su realización, a partir de un cultivo de 18 horas de *L. lactis* MG1363 se inoculará medio GM17 con calcio y magnesio al 2 % (v/v) y se incubará a 30 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5. A 9,9 mL de este cultivo se añadirá 0,1 mL de una dilución del fago sk1 de forma que el número de bacterias sea igual al de bacteriófagos. Se incubará entonces a 30 °C durante 5 minutos, transcurridos los cuales se retirarán 0,1 mL, que se añadirán a 9,9 mL de medio GM17 con calcio y magnesio precalentado (dilución A). Se mezclará bien y se llevará a un tubo con cloroformo, que se agitará empleando un vortex durante 10 segundos y almacenará en hielo, siendo este el control de adsorción. Otro mL se transferirá a 9 mL de medio precalentado (dilución B). De este, 1 mL se transferirá a otros 9 mL de medio precalentado (dilución C). Se obtendrán así 3 diluciones (A, B y C) que se incubarán a 30 °C y de las que se obtendrán muestras cada cierto tiempo (en un principio cada 2 minutos, tiempo que se ajustará después de la primera curva en función de los resultados). De estas muestras se realizará su titulación según el método de doble capa en agar antes empleado. Una vez finalizado el experimento se realizará la titulación también del control de adsorción. Este experimento se repetirá además añadiendo al medio distintas concentraciones de Lcn972.

Así, se obtendrán datos de ufp/mL a diferentes tiempos, que se representarán obteniendo una curva como la mostrada en la figura 14 (Kropinski, 2018).

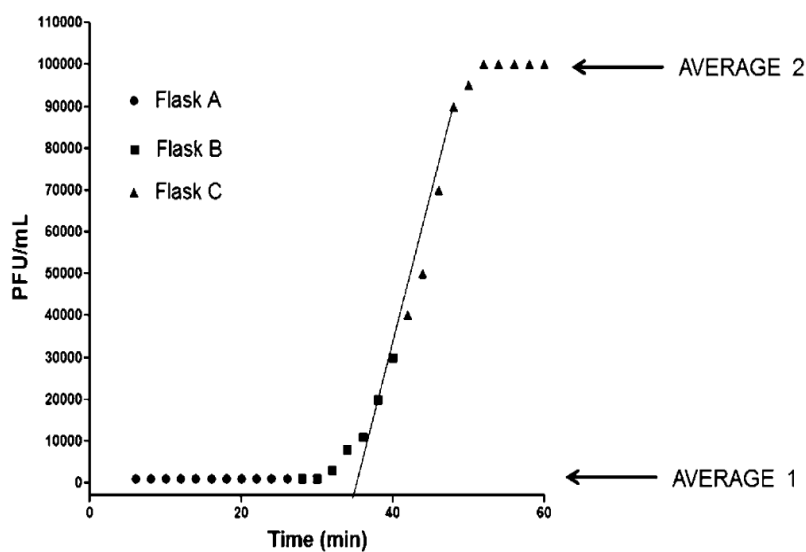


Figura 14. Curva obtenida en el experimento de la curva de un solo paso de un bacteriófago. (Kropinski 2018)

Se determinará la media de células infectadas restando el control de adsorción a la media 1 (average 1 en la figura). Dividiendo la media 2 (average 2 en la figura) entre este valor, se obtendrá el tamaño de explosión. Por último, determinando la intersección entre la línea de la media1 y la pendiente se obtendrá el periodo de latencia.

Se comparará por tanto el tamaño de explosión obtenido en presencia y ausencia de bacteriocina, determinando si como se espera este es menor en presencia de bacteriocina y se puede establecer una relación entre el tamaño de explosión y la concentración de Lcn972.

Resistencia de L. lactis MG1363 tras la exposición al fago sk1 y Lcn972

Se desconoce si las bacterias recuperadas tras la lisis producida por el fago sk1 son más resistentes a este. En presencia de Lcn972, se favorece su recuperación; sin embargo, no es seguro que la resistencia al fago sea mayor. Se plantea por tanto la necesidad de comprobar si las células recuperadas tras la lisis en presencia de Lcn972 son resistentes al fago, a la bacteriocina o ambos, así como si son más resistentes que las recuperadas únicamente en presencia de bacteriófago.

Para comprobarlo, en primer lugar, se aislarán colonias aisladas de los cultivos de *L. lactis* MG1363 realizados en presencia de únicamente fago sk1, solo Lcn972, y en presencia de fago sk1 y Lcn972 en las condiciones realizadas anteriormente, y sin ningún tratamiento como referencia. Se prepararán cultivos de 18 horas en GM17 para determinar su fenotipo de resistencia mediante el método de difusión en agar. En cultivos en césped en medio GM17 suplementado con calcio y magnesio, se añadirán, por una parte, pequeñas gotas de Lcn972 y, por otra parte, pequeñas gotas de fago sk1. Una vez incubados estos cultivos a 30 °C durante 24 horas, se analizarán los halos de inhibición producidos.

Se espera obtener diferencias en los halos de inhibición, que indicarían una mayor resistencia a la Lcn972 o al fago sk1 cuanto menor sean los halos de inhibición de los cultivos recuperados frente a los cultivos de la cepa original. Cabría esperar que, al menos un cierto porcentaje de las células aisladas tras el cultivo en presencia de fago sk1 sean resistentes a este fago. Otros autores han descrito la selección de resistentes como es el caso del estudio realizado empleando el fago FWLLm3 de *L. monocytogenes* en el que un 50 % de las células recuperadas tras el cultivo en presencia de fago resultaron resistentes (Rodríguez-Rubio et al., 2015). Podrían esperarse también diferencias en la actividad de la Lcn972, puesto que se ha demostrado que una exposición continuada a

concentraciones crecientes de Lcn972 da lugar a células resistentes a la bacteriocina, aunque en este trabajo las concentraciones empleadas, así como el tiempo de exposición son mucho menores a las empleadas en estos estudios (Roces et al., 2012; López-González et al., 2018). Respecto a la resistencia de los cultivos recuperados en presencia de ambos antimicrobianos (fago sk1 y Lcn972) podría esperarse de igual forma una mayor resistencia a ambos, estando relacionada la resistencia a Lcn972 con la resistencia al fago sk1, como ya determinaron otros autores en el caso de la nisina y los fagos $\phi 35$ y $\phi 88$ de *S. aureus* (Martínez et al., 2008) o de una mayor resistencia a la infección del fago sk1 por parte de colonias de *L. lactis* MG1364 resistentes a la Lcn972 (Roces et al., 2012). Las proporciones relativas de estos fenotipos nos servirían para explicar el fenómeno de recuperación de *L. lactis* MG1363 observado en los cultivos realizados en presencia de fago sk1 y Lcn972.

Diseño de una estrategia de control del fago sk1 en fermentaciones lácteas

Los resultados obtenidos en los experimentos in vitro en los que se observa que la presencia de Lcn972 favorece la recuperación de los cultivos de *L. lactis* MG1363 en presencia de fago sk1, concuerdan con resultados obtenidos en trabajos previos de otros autores en los que se observó una mayor resistencia a la infección por parte del fago sk1 de cultivos resistentes a Lcn972 (Roces et al., 2012). Todo ello lleva a pensar que una estrategia basada en una preadaptación de *L. lactis* MG1363 a la Lcn972 podría dar resultado, disminuyendo la sensibilidad al fago sk1 en una fermentación láctea.

Se realizará, por tanto, una preadaptación a la Lcn972 de *L. lactis* MG1363. Para ello, se inoculará *L. lactis* MG1363 al 2 % (v/v) en medio GM17 a partir de un cultivo de 18 horas y se incubará durante 24 horas con concentraciones subinhibitorias de Lcn972. Se evaluarán distintas concentraciones subinhibitorias de Lcn972 basándonos en los resultados obtenidos en la determinación de la MIC en cultivos con una densidad celular inicial de 5×10^7 ufc/mL (0.16 UA/mL, 0.63 UA/mL, 2.5 UA/mL y 10 UA/mL).

Una vez obtenidos los cultivos preadaptados, el objetivo será comparar la resistencia de estos al fago sk1 en comparación con la resistencia de la cepa original en una fermentación láctea en condiciones reales. Se analizarán, además, otras características tecnológicas con el objetivo de comparar las características de los cultivos originales con las características de los cultivos preadaptados, determinando así, si dicha preadaptación afecta a características fundamentales en el desarrollo de una fermentación láctea. Cabe

destacar que la cepa empleada requiere la adición a la leche de glucosa y extracto de levadura para su crecimiento, por lo que estos análisis son adecuados para analizar el comportamiento, pero no como un posible cultivo iniciador de cara a una fermentación real.

Para comprobar la resistencia al fago sk1 se estudiará la cinética de acidificación de los cultivos preadaptados y no adaptados en presencia de distintas concentraciones de fago. Para ello, a partir de un cultivo de 18 horas en leche con glucosa y extracto de levadura, se inocularán 100 mL de leche pasteurizada (con glucosa y extracto de levadura,) al 3 % (v/v) y se seguirá la evolución del pH utilizando el sistema de medición de pH en tiempo real.

En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos en un experimento similar, empleando fagos y cepas de *Lactococcus* que difieren en su susceptibilidad a la infección fágica. En ella se observan las curvas de descenso del pH en presencia y ausencia de fago, en una cepa sensible y en una resistente (Madera et al., 2003). Se observa como la presencia de fago ralentiza o incluso detiene la cinética de acidificación en el caso de la cepa sensible (figura 15b), pero no afecta a dicha cinética en el caso de la cepa resistente (figura 15a). Resultados similares a estos confirmarían la hipótesis de que una preadaptación con Lcn972 redundaría en una mayor resistencia al fago sk1 y pondrían de manifiesto el éxito de la estrategia empleada en el caso de una fermentación real.

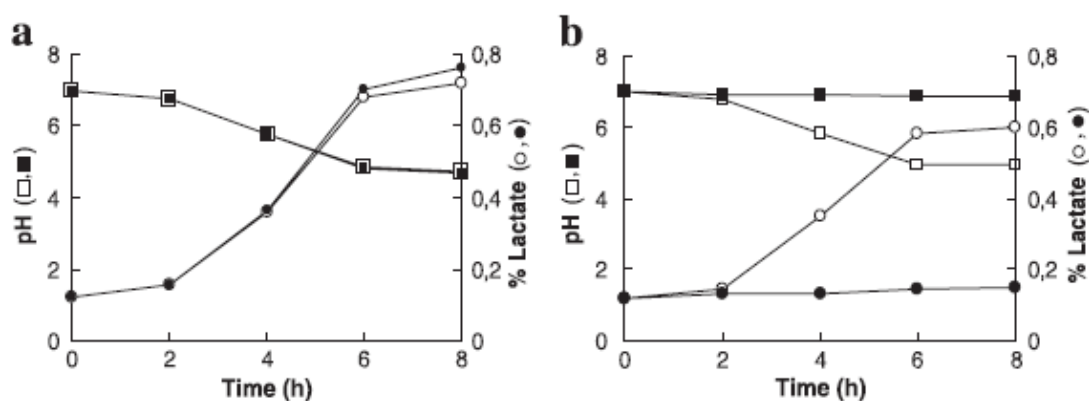


Figura 15. Cinética de acidificación de las cepas *L. lactis* 542 (a) y *L. lactis* MG1614 (b) durante 8 horas en leche, a 30 °C, en ausencia (■) y presencia (□) del fago ϕ 647. Resultados obtenidos por Madera et al. (2003).

Además se obtendrán muestras a tiempo 0, 3, 6 y 24 horas para determinar la acidez titulable, las células viables totales, los ácidos orgánicos producidos y el consumo de lactosa, parámetros de gran interés en la industria láctea.

Para determinar la acidez titulable se realizará una valoración con fenolftaleína y NaOH 0,1 N, calculando la acidez como gramos de ácido láctico por 100 mL de leche en función del volumen de NaOH consumido. Se comparará la acidez obtenida con ambos tipos de cultivo, teniendo en cuenta que el porcentaje mínimo necesario para que se produzca la coagulación de la leche es del 0,4 %.

El recuento de células viables se realizará mediante diluciones decimales seriadas en solución Ringer, sembrando dichas soluciones en placas de GM17 en profundidad. Se incubarán 72 horas a 30 °C, realizando después el recuento de las ufc/mL. Este recuento de células viables dará información acerca del crecimiento bacteriano, permitiendo obtener una idea de su metabolismo.

Para determinar la lactosa residual y los productos metabólicos a las muestras extraídas a distintos tiempo, se añadirá H₂SO₄ 4,5 mM y se mantendrán en agitación. Posteriormente, se centrifugarán a 14000 rpm, 4 °C durante 15 minutos, se filtrará el sobrenadante a través de filtros de 0,45 µm, y se pasarán las muestras a viales de HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia). Las muestras se separarán en una columna de intercambio iónico. Se usarán disoluciones de ácidos orgánicos y azúcares de concentraciones conocidas como estándares para la identificación y cuantificación. Este experimento permitirá determinar el consumo de lactosa y se comparará de igual forma el perfil de ácidos orgánicos producidos durante la fermentación.

Se considerará que esta estrategia ha sido exitosa si mediante la preadaptación con la Lcn972 se consigue reducir el efecto negativo del fago sk1 en la cinética de acidificación, sin perjudicar ningún parámetro de importancia en la fermentación láctea (producción de ácido láctico-consumo de lactosa, producción de ácidos orgánicos, etc.). Concretamente, se considera que una cepa de *L. lactis* puede ser empleada como cultivo iniciador en la elaboración de queso si es capaz de alcanzar un pH cercano a 4,6 (punto isoeléctrico de la caseína) tras 6 horas de incubación de un cultivo inoculado al 3 % (v/v) a 30 °C.

Conclusiones

El uso de bacteriocinas como estrategia en el control de bacteriófagos parece tener posibilidades de éxito basándonos en los resultados obtenidos. Este trabajo permite concluir que, en presencia de Lcn972, parece verse favorecida la recuperación de los cultivos de *L. lactis* MG1363 tras la infección por el fago sk1. Estos resultados obtenidos in vitro permiten plantear la preadaptación de *L. lactis* a la Lcn972 como una posible

estrategia en la reducción de la sensibilidad de las fermentaciones lácteas a la presencia de bacteriófagos.

Resulta por tanto de importancia el estudio de la interacción de las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores tanto con los bacteriófagos como con las bacteriocinas, pudiendo extraer de este estudio varias conclusiones más específicas:

- La MOI necesaria para provocar la lisis de un cultivo de *L. lactis* MG1363 por el fago sk1es menor cuando se emplea una densidad celular inicial mayor debido a una mayor posibilidad de encuentro entre el fago y la bacteria.
- Aunque en menor medida, el tamaño del inóculo afecta a la MIC de las bacteriocinas, siendo mayor en inóculos de mayor tamaño.
- La presencia de calcio y magnesio no afecta a la actividad inhibitoria de las bacteriocinas Lcn972 y nisina.
- La presencia de Lcn972 acelera la lisis de *L. lactis* MG1363 provocada por el fago sk1, la densidad óptica alcanzada antes de que esta se produzca es menor.

Bibliografía

- Aguilar-Pérez, C., Gracia, B., Rodrigues, L., Vitoria, A., Cebrián, R., Deboosère, N., Song, O., Brodin, P., Maqueda, M. y Aínsa, J.A. 2018. «Synergy between Circular Bacteriocin AS-48 and Ethambutol against *Mycobacterium tuberculosis*». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (9).
- Bidlas, E., Du, T. y Lambert, R.V. 2008. «An Explanation for the Effect of Inoculum Size on MIC and the Growth/No Growth Interface». *International Journal of Food Microbiology* 126 (1-2): 140-52.
- Bigwood, T., Hudson, J.A. y Billington C. 2009. «Influence of Host and Bacteriophage Concentrations on the Inactivation of Food-Borne Pathogenic Bacteria by Two Phages». *FEMS Microbiology Letters* 291 (1): 59-64.
- Böttiger, T., Schneider, T., Martínez, B., Sahl, H.G. y Wiedemann, I. 2009. «Influence of Ca(2+) Ions on the Activity of Lantibiotics Containing a Mersacidin-like Lipid II Binding Motif». *Applied and Environmental Microbiology* 75 (13): 4427-34.
- Cavanagh, D., Fitzgerald, G.F., y McAuliffe, O. 2015. «From Field to Fermentation: The Origins of *Lactococcus Lactis* and Its Domestication to the Dairy Environment». *Food Microbiology* 47: 45-61.

- Chandry, P., Barrie, S., Davidson, E., y Hillier, A.J. 1994. «Temporal transcription map of the *Lactococcus lactis* bacteriophage sk1». *Microbiology*, 140 (9): 2251-61.
- Chapot-Chartier, M.P. 2014. «Interactions of the Cell-Wall Glycopolymers of Lactic Acid Bacteria with Their Bacteriophages». *Frontiers in Microbiology* 5: 236.
- Dall, G.F., Tsang, S.J., Gwynne, P.J., MacKenzie, S.P., Simpson, A., Breusch, S.J., y Gallagher, M.P. 2018. «Unexpected Synergistic and Antagonistic Antibiotic Activity Against *Staphylococcus* Biofilms». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73(7):1830-1840.
- De Vuyst, L. y Vandamme E.J. 1992. «Influence of the Carbon Source on Nisin Production in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Batch Fermentations». *Journal of General Microbiology* 138 (3): 571-78.
- Deveau, H., Labrie, S.J., Chopin, M.C. y Moineau, S. 2006. «Biodiversity and classification of lactococcal phages». *Applied and Environmental Microbiology* 72 (6): 4338-46.
- Egervärn, M., Lindmark, H., Roos, S., Huys, G. y Lindgren, S. 2007. «Effects of Inoculum Size and Incubation Time on Broth Microdilution Susceptibility Testing of Lactic Acid Bacteria». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (1): 394-96.
- Escobedo, S., Campelo, A.B., Wegmann, U., García, P., Rodríguez, A., y Martínez, B. 2019. «Insight into the Lytic Functions of the Lactococcal Prophage TP712». *Viruses* 11 (10).
- Forde, A. y Fitzgerald, G.F. 2003. «Molecular Organization of Exopolysaccharide (EPS) Encoding Genes on the Lactococcal Bacteriophage Adsorption Blocking Plasmid, PCI658». *Plasmid* 49 (2): 130-42.
- Galván Márquez, I.J., McKay, B., Wong, A., Cheetham, J.J., Bean, C., Golshani, A. y Smith, M.L. 2020. «Mode of Action of Nisin on *Escherichia coli*». *Canadian Journal of Microbiology* 66 (2): 161-68.
- Garneau, J.E. y Moineau, S. 2011. «Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations». *Microbial Cell Factories* 10 (Suppl 1): S20.
- Hagens, S. y Loessner, M.J. 2010. «Bacteriophage for Biocontrol of Foodborne Pathogens: Calculations and Considerations». *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11 (1): 58-68.

- Hati, S., Mandal, S. y Prajapati, J.B. 2013. «Novel Starters for Value Added Fermented Dairy Products». *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* 1 (1): 83-91.
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K. y Doble, M. 2008. «Synergism between Natural Products and Antibiotics against Infectious Diseases». *Phytomedicine* 15 (8): 639-52.
- Hernández, A. 2007. «Aislamiento, caracterización y detección precoz de bacteriófagos de *Streptococcus thermophilus* en la industria láctea». Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo.
- Hill, D., Sugrue, I., Arendt, E., Hill, C., Stanton, C. y Ross, R.P. 2017. «Recent advances in microbial fermentation for dairy and health». 6: 751.
- Hinrichs, J. 2004. «Mediterranean Milk and Milkproducts». *European Journal of Nutrition* 43 (1): i12-17.
- Holo, H., Nilssen, O., y Nes, I.F. 1991. «Lactococcin A, a New Bacteriocin from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*: Isolation and Characterization of the Protein and Its Gene». *Journal of Bacteriology* 173 (12): 3879-87.
- Jarvis, A.W. 1978. «Serological studies of a host range mutant of a lactic streptococcal bacteriophage.» *Applied and Environmental Microbiology* 36 (6): 785-89.
- Johansen, H.K., Jensen, T.G., Dessau, R.B., Lundgren, B. y Frimodt-Møller, N. 2000. «Antagonism between Penicillin and Erythromycin against *Streptococcus pneumoniae* in Vitro and in Vivo». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46 (6): 973-80.
- Jordan, S., Hutchings, M.I. y Mascher, T. 2008. «Cell Envelope Stress Response in Gram-Positive Bacteria». *FEMS Microbiology Reviews* 32 (1): 107-46.
- Kasman, L.M., Kasman, A., Westwater, C., Dolan, J., Schmidt, M.G. y Norris, J.S. 2002. «Overcoming the Phage Replication Threshold: A Mathematical Model with Implications for Phage Therapy». *Journal of Virology* 76 (11): 5557-64.
- Kindstedt, P.S. 2013. «The Basics of Cheesemaking». *Microbiology Spectrum* 1 (1).
- Knezevic, P., Curcin, S., Aleksic, V., Petrusic, M. y Vlaski, L. 2013. «Phage-Antibiotic Synergism: A Possible Approach to Combatting *Pseudomonas aeruginosa*». *Research in Microbiology* 164 (1): 55-60.
- Kropinski A.M. 2018. «Practical Advice on the One-Step Growth Curve». En: Clokie M., Kropinski A., Lavigne R. «Bacteriophages. Methods in Molecular Biology». CRC Press.

- Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R. y Sulakvelidze, A. 2003. «Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut Produce by Treatment with Lytic Bacteriophages and a Bacteriocin». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8): 4519-26.
- Linares, D.M., Kok, J. y Poolman, B. 2010. «Genome Sequences of *Lactococcus lactis* MG1363 (Revised) and NZ9000 and Comparative Physiological Studies». *Journal of Bacteriology* 192 (21): 5806-12.
- López-González, M.J., Campelo, A.B., Picon, A., Rodríguez, A. y Martínez, B. 2018. «Resistance to bacteriocin Lcn972 improves oxygen tolerance of *Lactococcus lactis* IPLA947 without compromising its performance as a dairy starter». *BMC Microbiology* 18: 76.
- Ly-Chatain, M.H., Moussaoui, S., Vera, A., Rigobello, V. y Demarigny, Y. 2013. «Antiviral effect of cationic compounds on bacteriophages». *Frontiers in Microbiology* 4:46.
- Madera, C., García, P., Janzen, T., Rodríguez, R. y Suárez, J.E. 2003. «Characterisation of Technologically Proficient Wild *Lactococcus Lactis* Strains Resistant to Phage Infection». *International Journal of Food Microbiology* 86 (3): 213-22.
- Mahony, J., Tremblay, D.M., Labrie, S.J., Moineau, S. y van Sinderen, D. 2015. «Investigating the Requirement for Calcium during Lactococcal Phage Infection». *International Journal of Food Microbiology* 201: 47-51.
- Martínez, B., Rodríguez, A. y Suárez, J.E. 2000. «Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibits septum formation in lactococci». *Microbiology*, 146 (4): 949-55.
- Martínez, B., Zomer, A.L., Rodríguez, A., Kok, J. y Kuipers, O.P. 2007. «Cell Envelope Stress Induced by the Bacteriocin Lcn972 Is Sensed by the Lactococcal Two-Component System CesSR». *Molecular Microbiology* 64 (2): 473-86.
- Martínez, B., Obeso, J.M., Rodríguez, A. y García, P. 2008. «Nisin-Bacteriophage Crossresistance in *Staphylococcus aureus*». *International Journal of Food Microbiology* 122 (3): 253-58.
- Martínez, B., Böttiger, T., Schneider, T., Rodriguez, A., Sahl, H. y Wiedemann, I. 2008. «Specific Interaction of the Unmodified Bacteriocin Lactococcin 972 with the Cell Wall Precursor Lipid II». *Applied and environmental microbiology* 74 (15): 4666-4670

- Martínez, B., Rodríguez, A. y Suárez J.E. 2016. «Antimicrobial Peptides Produced by Bacteria: The Bacteriocins». En Villa, T. y Viñas, M. «New Weapons to Control Bacterial Growth». Springer International Publishing.
- Mills, S., Ross, R.P. y Hill, C. 2017. «Bacteriocins and Bacteriophage; a Narrow-Minded Approach to Food and Gut Microbiology». FEMS Microbiology Reviews 41 (Supp_1): S129-53.
- Moineau, S. y Lèvesque, C. 2004. «Control of bacteriophages in industrial fermentations». En Kutter, E. y Sulakvelidze, A. «Bacteriophages: biology and applications». CRC Press.
- Pujato, S.A., Quiberoni, A. y Mercanti, D.J. 2019. «Bacteriophages on Dairy Foods». Journal of Applied Microbiology 126 (1): 14-30.
- Qaiyumi, S. 2007. «Macro and microdilution methods of antimicrobial susceptibility testing». En Schwalbe, R., Steele-Moore, L. y Goodwin, A.C «Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols». CRC Press.
- Roces, C., Courtin, P., Kulakauskas, S., Rodríguez, A., Chapot-Chartier, M.P., Martínez, B. 2012. «Isolation of *Lactococcus lactis* mutants simultaneously resistant to the cell wall-active bacteriocin Lcn972, lysozyme, nisin, and bacteriophage c2». Applied and environmental microbiology 78(12):4157-4163.
- Rodríguez-Rubio, L., García, P., Rodríguez, A., Billington, C., Hudson, J.A. y Martínez, B. 2015. «Listeriaphages and Coagulin C23 Act Synergistically to Kill *Listeria Monocytogenes* in Milk under Refrigeration Conditions». International Journal of Food Microbiology 205: 68-72.
- Ryan, E.M., Alkawareek, M.Y., Donnelly, R.F. y Gilmore, B.F. 2012. «Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms in vitro». FEMS Immunology and Medical Microbiology 65 (2): 395-98.
- Samson, J.E. y Moineau, S. 2013. «Bacteriophages in Food Fermentations: New Frontiers in a Continuous Arms Race». Annual Review of Food Science and Technology 4: 347-68.
- Suárez, J.E. 2019. «Virus de microorganismos procariotas». En Martín, A., Béjar V., Gutiérrez, J.C., Llagostera, M. y Quesada, E. «Microbiología esencial». Editorial médica panamericana.
- Terzaghi, B.E. y Sandine, W.E. 1975. «Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages». Applied Microbiology 29 (6): 807-13.

- Turner, D., Lamosa, P., Rodriguez, A. y Martínez, B. 2013. «Structure and properties of the metastable bacteriocin Lcn972 from *Lactococcus lactis*». *Journal of Molecular Structure* 1031: 207–210.
- Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C. y Ventura, M. 2007. «Complete Genome Sequence of the Prototype Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363». *Journal of Bacteriology* 189 (8): 3256-70.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B. y Sahl, H.G. 2001. «Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (3): 1772-79.
- Wróblewska, M. 2006. «Novel Therapies of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Infections: The State of the Art». *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 54 (2): 113-20.