

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MOLECULAR DE  
ESTREPTOCOCOS LACTICOS

ALDA LUIZA LOUREIRO DOS SANTOS

Tese apresentada à Escola Superior  
de Agricultura "Luiz de Queiróz"  
da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de DOUTOR em  
Agronomia - área de concentração:  
Genética e Melhoramento de Plantas

PIRACICABA  
Estado de São Paulo  
Novembro - 1985

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MOLECULAR DE  
ESTREPTOCOCOS LACTICOS

ALDA LUIZA LOUREIRO DOS SANTOS

Engenheira Agrônoma

Instituto de Tecnologia de Alimentos

Orientador: Dr. João Lúcio de Azevedo

Tese apresentada à Escola Superior  
de Agricultura "Luiz de Queiróz"  
da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de DOUTOR em  
Agronomia - área de concentração:  
Genética e Melhoramento de Plantas

PIRACICABA  
Estado de São Paulo  
Novembro - 1985

*i*

*A meus pais*

*A Pascal*

DEDICO

*A Marie-Christine, Alain,  
Michel Gautier, demais membr  
os e bons amigos do la-  
boratório do INRA de Rennes*

OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço* a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

• Ao Professor *Dr. João Lucio de Azevedo*, pela orientação, confiança, estímulo e amizade.

• À *Dra. Marie-Christine Chopin*, pelo estágio proporcionado em seu laboratório, pela orientação, pelo incentivo e amizade.

• Ao *Dr. Jean-Louis Maubois*, Diretor do Laboratoire de Recherches de Technologie Laitière - INRA, pelo convite e facilidades concedidas para a realização de estágio, assim como deste trabalho, além da grande amizade e apoio nos momentos difíceis.

• Ao *Dr. Alain Chopin*, pelos conhecimentos transmitidos, colaboração e amizade.

• À amiga *Monique Veaux*, pela colaboração, companheirismo e as valiosas "dicas" de francês.

• Ao *Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão*, pela revisão dos originais.

• Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), na pessoa do seu Diretor *Dr. Rodrigo Otávio Teixeira Neto*, pelas facilidades concedidas.

o À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela oportunidade de realização de estágio no INRA, França.

o Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de pesquisa concedida.

o À Seção de Leite e Derivados do ITAL, à técnica de laboratório *Izildinha Moreno* e demais amigos que lá trabalham, pela colaboração.

o Aos funcionários da Biblioteca do ITAL e, em especial, a *Antonieta Matos*, pelo auxílio prestado.

o À *Vera Maria Barbosa Luporini* e *Cristina Helena R. Comodo Gonçalves*, pela revisão ortográfica.

o À *Dora Regina Duarte Chiaramonte*, pela confecção dos gráficos.

o Às amigas *Graciana da Penha Rossato Sancho*, pela datilografia do manuscrito e *Carmen Silvia Barros Penteado*, pela paciência e eficiência na datilografia final, feita em tempo "record".

o Ao querido amigo *Michel Gautier*, pela valorosa troca de informações, colaboração e imenso carinho em todas as horas.

• Aos amigos *Annette Rouault, Daniel Simon, Philippe Langella* e *Marie-Therèse Bernard*, pela colaboração e amizade na convivência no laboratório.

• Aos guardinhas *Odair Amancio Lopes* e *Antonio Santos Mendonça*, pela colaboração na confecção das cópias xerox.

• Às estagiárias *Adriana L.C. Balys* e *Maria Aparecida Lima*, pela colaboração.

• Aos meus amigos de todos os momentos, especialmente *Pascaline Garnot, Jacky Desmeulles, Stella Vieco, Michel Mahaut, Jean Marie Laurent, Daniel Molle, Paul Ducruet, Christian Corre, Christiane Hulin, Anne-Marie Renoird* e *Gaby*, que com seu apoio me ajudaram a "seguir em frente".

## ÍNDICE

	Página
1. RESUMO .....	1
2. INTRODUÇÃO .....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	7
3.1. Bactérias lácticas .....	7
3.2. Bacteriófagos .....	16
3.3. Sistemas de Restrição/Modificação .....	28
3.4. Controle de bacteriófagos .....	33
3.5. Plasmídios e Melhoramento Genético .....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	51
4.1. Microrganismos utilizados .....	51
4.2. Plasmídios utilizados .....	53
4.3. Bacteriófagos utilizados .....	54
4.4. Esterilização e número de repetições .....	54
4.5. Meios de cultura e soluções utilizadas .....	55
4.5.1. Meio M17 .....	55
4.5.2. Meio M17 + Glicose .....	55
4.5.3. Meio M17 + Sacarose .....	56
4.5.4. Meio M17 a 10% .....	56
4.5.5. Meio de Luria e Bertani .....	56
4.5.6. Meio M17 + Glicose + Glicerol .....	57
4.5.7. Solução de Ringer .....	57
4.5.8. Leite RSM para manutenção .....	57
4.5.9. Leite RSM .....	58
4.5.10. Tampão de lise para extração preparativa de plasmídios .....	58
4.5.11. Tampão de lise .....	58
4.5.12. Tampão paralisador de lise .....	59
4.5.13. Tampão para protoplastos .....	59
4.5.14. TE .....	59



	Página
4.5.15. TE para diálise .....	59
4.5.16. TES .....	59
4.5.17. TERNase .....	60
4.5.18. Tampão para extração de DNA cromossômico .....	60
4.5.19. SMM .....	60
4.5.20. SMM x 2 .....	60
4.5.21. SMM + M17 .....	61
4.5.22. PEG 40% .....	61
4.5.23. Tampão para digestão com enzima de restrição..	61
● Tampão de baixa concentração salina ("Low- -salt buffer")	
4.5.24. Tampão para eletroforese Tris-Borato .....	61
4.5.25. Tampão de ligação .....	62
4.6. Capacidade de coagulação do leite RSM a 23 <sup>o</sup> C durante 18 horas .....	62
4.7. Teste de sensibilidade à temperatura .....	62
4.8. Método de semeadura para determinação do título de bac- terió•fagos .....	63
4.9. Determinação da liberação espontânea de bacteriófagos..	63
4.10. Verificação de lisogenia através de indução com luz ul- travioleta .....	64
4.11. Titulação de bacteriófagos pela técnica de gotas .....	66
4.12. Preparação de estoques com alto título de fagos .....	66
4.13. Concentração de fagos por polietileno-glicol .....	67
4.14. Extração de plasmídios .....	67
4.14.1. Micro-método para a determinação rápida de perfis plasmidiais .....	67
4.14.2. Extração preparativa e purificação de plasmí- dios .....	68
4.15. Eletroforese em gel de agarose .....	70
4.16. Eletroforese bidimensional .....	71
4.17. Estimativa do peso molecular dos plasmídios a partir de gel de eletroforese em agarose .....	72
4.18. Titulação do DNA plasmidial e cromossômico .....	73

4.19.	Recuperação do DNA plasmidial a partir do gel de agarose .....	73
4.20.	Obtenção e regeneração de protoplastos .....	74
4.21.	Preparação de DNA plasmidial sob forma linear .....	75
4.22.	Extração preparativa de DNA cromossômico .....	76
4.23.	Digestão parcial do DNA cromossômico por endonucleases de restrição .....	76
4.24.	Centrifugação em gradiente de sacarose .....	77
4.25.	Formação do DNA recombinante .....	78
4.26.	Transformação de protoplastos .....	78
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	81
5.1.	Testes tecnológicos efetuados com estreptococos lácticos pertencentes à Coleção de Culturas Láticas do ITAL .....	81
5.1.1.	Capacidade de coagulação do leite RSM a 23°C durante 18 horas .....	81
5.1.2.	Teste de sensibilidade à temperatura .....	84
5.1.3.	Teste de liberação espontânea de bacteriófagos. ....	89
5.2.	Perfil de plasmídios de estreptococos lácticos pertencentes à coleção do ITAL .....	90
5.3.	Tipagem e nível de sensibilidade de estreptococos lácticos da coleção do ITAL a fagos virulentos pertencentes à coleção do INRA .....	98
5.4.	Determinação de mecanismos de resistência em estreptococos lácticos da coleção do ITAL .....	103
5.5.	Verificação de lisogenia em estreptococos da coleção do ITAL por meio de indução com luz ultravioleta (U.V.) ..	108
5.6.	Estudos feitos com o <i>Streptococcus cremoris</i> , linhagem IL 839, pertencente à coleção do INRA .....	116
5.6.1.	Evidência de um sistema de restrição/modificação .....	116
5.6.2.	Caracterização e determinação do peso molecular dos plasmídios de <i>S. cremoris</i> IL 839 ....	117
5.6.3.	Localização dos genes que codificam o sistema de restrição/modificação presente em <i>S. cremoris</i> IL 839 .....	122

	Página
5.6.3.1. Plasmídios .....	122
(a) Cura de plasmídios .....	122
(b) Preparação do plasmídio pIL 21 por recuperação a partir de um gel de agarose .....	125
(c) Transferência do plasmídio pIL 21 por cotransformação .....	128
5.6.3.2. Cromossomo .....	129
(a) Extração preparativa do DNA cro- mossômico de <i>S. cremoris</i> IL 839 ..	132
(b) Digestão parcial do cromossomo de IL 839 por Hpa II .....	132
(c) Seleção por tamanho dos fragmentos cromossomais de IL 839 .....	135
(d) Fabricação do DNA recombinante ...	137
(e) Transformação .....	137
6. CONCLUSÕES .....	141
7. SUMMARY .....	144
8. LITERATURA CITADA .....	147

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela	
I. Resultados da capacidade de coagulação do leite após incubação a 23°C durante 18 horas .....	83
II. Efeito da temperatura de incubação na capacidade acidificante .....	86
III. Sensibilidade de estreptococos lácticos brasileiros aos fagos virulentos da coleção do INRA .....	100
IV. Nível de sensibilidade dos estreptococos lácticos brasileiros aos fagos virulentos da coleção do INRA .....	102
V. Evidência de um mecanismo de restrição/modificação presente na linhagem 310, ativo contra o fago 66 .....	105
VI. Evidência de um mecanismo de restrição/modificação presente na linhagem 162, ativo contra o fago 66 .....	106
VII. Evidência de um mecanismo de resistência apresentado pela linhagem 105, devido a mutações sofridas pelo fago 188 .....	107
VIII. Espectro lítico de fagos liberados após indução com luz ultravioleta .....	111
IX. Agrupamento dos estreptococos lácticos pertencentes à coleção do ITAL, de acordo com a classificação proposta por CHOPIN <i>et alii</i> (1976) e REYROLLE <i>et alii</i> (1982) .....	115
X. Evidência da presença de um mecanismo de R/M em <i>S. cremoris</i> IL 839, ativo sobre o fago 8 .....	118

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Curvas de atividade da cultura 166 com liberação espontânea de fagos, sendo C = tubos-controle e T = tubos-teste ..	91
2. Curvas de atividade da cultura 280 com liberação espontânea de fagos, sendo C = tubos-controle e T = tubos-teste ...	92
3. Diferentes perfis de plasmídios de linhagens de estreptococos lácticos da coleção do ITAL .....	94
4. Diferentes perfis de plasmídios de linhagens de estreptococos lácticos da coleção do ITAL .....	95
5. Perfis de plasmídios idênticos de linhagens de estreptococos lácticos da coleção do ITAL .....	97
6. Evolução da densidade óptica da linhagem 96 com (T) e sem (C) indução com uma dose de $20 \text{ J.m}^{-2}$ de radiação U.V. ....	110
7. Perfil e eletroforese bidimensional dos plasmídios de <i>S. cremoris</i> IL 839 .....	120
8. Eletroforese horizontal dos plasmídios pBR 322, pVA 749 $\Delta$ , pVA 856, de IL 839 e de IL 1437 .....	121
9. Perfis de plasmídios de variantes de <i>S. cremoris</i> IL 839, obtidos pela cura de plasmídios .....	123
10. Perfis de plasmídios de variantes de <i>S. cremoris</i> IL 839, obtidos pela cura de plasmídios .....	124
11. Eletroforese vertical de uma extração preparativa dos plasmídios de IL 839 .....	126
12. Eletroforese vertical de uma extração preparativa dos plasmídios de IL 839, após recorte da banda relativa ao plasmídio pIL 21 .....	127

13.	Transferência de um plasmídeo críptico de <i>S. cremoris</i> IL 839 para <i>S. lactis</i> IL 1403 por cotransformação .....	130
14.	Digestão parcial do cromossomo de <i>S. cremoris</i> IL 839 pela enzima de restrição Hpa II .....	134
15.	Eletroforese vertical dos fragmentos obtidos por digestão parcial do cromossomo IL 839 após passagem por gradiente de sacarose .....	136
16.	DNA recombinante formado pelo cromossomo de <i>S. cremoris</i> IL 839 e pelo plasmídeo pVA 749 $\Delta$ . (a) DNA do fago $\lambda$ digerido por Hind II; (b) cromossomo IL 839 e pVA 749 $\Delta$ digeridos por Hpa II, antes de ligação; (c) cromossomo IL 839 e pVA 749 $\Delta$ digeridos por Hpa II, após ligação .....	138

## 1. RESUMO

O presente trabalho foi conduzido com duas finalidades principais: (1) obter uma melhor caracterização de linhagens de estreptococos lácticos, pertencentes à Coleção de Fermentos Lácticos do ITAL e (2) estudar o determinismo genético de um sistema de resistência a bacteriófagos presente em *S. cremoris* linhagem IL 839, pertencente à coleção de culturas lácticas do INRA, com o objetivo de cloná-lo.

Verificou-se que dentre 124 culturas de bactérias lácticas pertencentes à coleção do ITAL, apenas 17 não cresceram a 23°C durante 18 horas, sendo este o primeiro teste de seleção que se efetua com culturas lácticas mesófilas. Essas culturas resistiram bem às temperaturas de cozimento, sem alteração na sua atividade acidificante e apenas duas linhagens,

166 e 280, liberaram espontaneamente bacteriófagos, não devendo ser utilizadas em fermentos lácticos.

Dentre 58 culturas lácticas pertencentes à mesma coleção, 21 apresentaram perfis de plasmídios diferentes, observando-se, para as restantes, 6 tipos de perfis análogos. Todas as culturas que possuíam perfis distintos mostraram-se lisogênicas, com liberação de profagos após indução com luz ultravioleta. Através do espectro lítico apresentado pelas mesmas em relação a fagos virulentos e aos profagos liberados, pode-se classificá-las em três grupos, a saber: grupo  $G_1$  = linhagem 168; grupo  $G_2$  = linhagens 307, 309, 16 e 262 e grupo  $G_3$  = linhagens 310, 96, 97, 305, 163, 175, 179, 162. Observou-se, ainda, que as culturas 310 e 162 apresentavam sistemas de restrição e modificação de 4 log e 2 log, respectivamente em relação aos fagos 66, 67 e 188 no caso da primeira delas e 66 para a segunda.

A linhagem de *S. cremoris* IL 839, apresentou um sistema de restrição e modificação de 5 log em relação ao fago 8. Verificou-se que esta linhagem possuía 8 plasmídios designados de pIL 20 a pIL 27, com pesos moleculares de 3, 5, 6, 9, 14, 15, 17 e 46Kb. Utilizando-se o método de protoplastização obteve-se cura de plasmídios, podendo-se determinar que nenhum deles estava relacionado ao sistema de R/M. O plasmídio pIL 21, não curado, foi cotransformado juntamente com um plasmídio indicador pHV 1301, resistente à eritromicina, para uma



linhagem de *S. lactis* IL 1403 desprovida de plasmídios, verificando-se que os cotransformantes também não haviam adquirido o sistema de R/M. Concluiu-se, então, que aquele sistema era codificado por genes localizados no cromossomo.

Realizou-se digestão parcial do cromossomo com a enzima de restrição Hpa II, posterior seleção dos fragmentos por tamanho em gradiente de sacarose e ligação dos mesmos a um plasmídio vetor pVA 749 $\Delta$ , possuindo marca de resistência à eritromicina, também linearizado pela mesma enzima. Células de *S. lactis* IL 1403 transformadas por este DNA recombinante possuíam somente o plasmídio vetor, o qual não consegue se manter dentro daquela linhagem desde que possua uma inserção.

## 2. INTRODUÇÃO

A produção da maior parte dos queijos e outros produtos derivados do leite baseia-se na fermentação láctica efetuada, principalmente pelos estreptococos do grupo N. Entre eles, os *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* e *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* são diretamente responsáveis pela acidificação do leite por meio da transformação da lactose em ácido láctico e, conseqüentemente, pelas qualidades organolépticas dos produtos lácticos.

Enquanto que na maior parte das indústrias de fermentação são utilizadas linhagens de microrganismos selecionadas e melhoradas geneticamente, a indústria de laticínios apenas dispõe, em geral, de culturas selvagens, com propriedades mal definidas e utilizadas em misturas.

Dentre os problemas que impedem a utilização de culturas puras selecionadas, um dos mais importantes é a destruição por bacteriófagos durante os processamentos industriais. A ocorrência de fagos causa perdas econômicas muito importantes às fabricações de queijo e impede qualquer emprego racional de linhagens já melhoradas para caracteres tecnológicos interessantes.

Diversas tentativas de controlar as infecções por bacteriófagos têm sido feitas como, por exemplo, a utilização de procedimentos práticos, ou seja, a inoculação direta nas dornas de fermentação, a elaboração de meios inibidores de fagos para a multiplicação das culturas lácticas, a rotação de culturas e o uso de vários sistemas de fermentos lácticos.

Os fermentos lácticos utilizados atualmente no mundo, pertencem a três grupos: (1) linhagens mistas; (2) linhagens múltiplas ou (3) linhagens simples. Entretanto, não há uma maneira de se prever dentro de quanto tempo um fago virulento aparecerá e atacará as linhagens componentes destes fermentos. As maneiras pelas quais um novo fago surge incluem os fagos temperados de linhagens lisogênicas, fagos provenientes de linhagens selvagens presentes no leite cru, mutações em fagos já existentes e, possivelmente, recombinações entre fagos virulentos e temperados.

Todos esses procedimentos, portanto, além de não prevenirem completamente a infecção fágica, necessitam de instrumentos que nem sempre estão disponíveis na indústria. Ademais, os bacteriófagos multiplicam-se em profusão, sendo que

uma fábrica pode produzir aproximadamente  $10^{16}$  fagos diariamente.

As possibilidades crescentes de manipulações genéticas em bactérias lácticas oferecem uma nova forma de controlar o desenvolvimento de fagos nas indústrias de laticínicos. Torna-se possível, assim, considerar-se a construção de linhagens melhoradas por meio da clonagem de genes que codificam mecanismos de resistência a fagos.

Este trabalho teve dois objetivos principais, ou sejam:

(1) Melhor caracterização de culturas lácticas pertencentes à Coleção de Fermentos Lácticos do ITAL;

(2) Estudo genético de um sistema de resistência a bacteriófagos com o propósito de cloná-lo.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. *Bactérias Láticas*

Por milhares de anos o homem usou a flora bacteriana natural do leite para produzir queijo e outros produtos derivados que ele utilizava em sua alimentação. Entretanto, o conhecimento do que ocorria no leite para que ele coagulasse só aconteceu muito tempo depois, quando em 1873 LISTER isolou o *Streptococcus lactis*, a bactéria láctica mais numerosa e comum no leite (SANDINE, 1980).

As bactérias lácticas apresentam-se sob duas formas clássicas: bastonetes e cocos. São ambas Gram positivas, microaerófilas, imóveis, nunca formam esporos, não reduzem nitrato, são proteolíticas e catalase negativas. Possuem como característica principal a utilização preferencial de lactose como

fonte de carbono, produzindo, a partir dessa fermentação, quase que exclusivamente ácido láctico, no caso de bactérias homo fermentativas, ou outras substâncias adicionais, tais como ácido acético, dióxido de carbono, etanol, ácido fórmico e glicérol, no caso de bactérias heterofermentativas (KOSIKOWSKI, 1977).

De acordo com FOSTER *et alii* (1957) a capacidade fermentativa varia de acordo com a espécie da bactéria, obtendo-se uma produção de ácido láctico entre 0,5% e 1,0%, podendo ocorrer numa ampla faixa de temperatura de 10°C - 50°C.

Segundo KOSIKOWSKI (1977) o ácido coagula a caseína do leite a pH 4,6, seu ponto isoelétrico. Essa coagulação envolve a formação de grandes agregados estruturais das micelas dispersas de caseína. TUMERMAN e WEBB (1965) citam que a caseína é uma fosfoproteína heterogênea, contendo três componentes eletroforeticamente distintos, designados  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , em ordem decrescente de eletromobilidade. Citam ainda que a dispersão das micelas de caseína é regulada por um equilíbrio reversível de íons de cálcio, fosfato, citrato e magnésio no soro do leite.

Os estudos taxonômicos das bactérias lácticas iniciaram-se na segunda década deste século, compreendendo, atualmente, um grande número de espécies pertencentes a quatro gêneros: *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* (SHARPE e FRYER, 1966).

O gênero *Leuconostoc*, representado principalmente por *L. cremoris*, *L. dextranicum* e *L. citrovorum*, é composto por pares e cadeias de células esféricas, podendo-se considerá-lo como cocos heterofermentativos, pois produzem ácido acético, etanol, dióxido de carbono e ácido láctico de configuração D (BUCHANAN e GIBSON, 1975). Produzem ácido a partir de glicose, não são particularmente ativos no leite e raras vezes o coagulam, havendo algumas cepas que são incapazes de fermentar a lactose (ABD-EL-MALEK e GIBSON, 1948 e STADHOUDERS, 1974). Sua importância reside no fato de fermentar o citrato, principalmente o *L. cremoris*, conferindo o aroma característico do queijo (SHARPE, 1979). Em meio favorável pode produzir volumes apreciáveis de diacetil e acetil-metil-carbinol, sendo algumas linhagens produtoras de acetaldeído (COX, 1977; LAWRENCE *et alii*, 1976 e REITER, 1973).

Os *Pediococcus* são formados por células esféricas dispostas em tétrades, são homofermentativos, produzindo ácido láctico de configuração DL. Sua importância reside na maturação de vários tipos de queijos (DACRE, 1958 e FRYER e SHARPE, 1966).

Os *Lactobacillus* são bactérias em forma de bastonetes homo e heterofermentativos, com temperaturas de crescimento variando de 10°C a 40°C e com a maioria das espécies produtoras de ácido láctico a partir de glicose, possuindo, este ácido, uma configuração variável (FOSTER *et alii*, 1957 e SHARPE e FRYER, 1966). As espécies de maior interesse para a microbiologia de leite são *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L.*

*helveticus* e *L. bulgaricus*. Juntamente com o *S. thermophilus*, algumas dessas bactérias constituem-se nos fermentos termófilos utilizados para a produção de iogurte, queijos de massa dura, leites acidificados, ácido láctico e vegetais fermentados.

Algumas das bactérias lácticas mais importantes encontram-se no gênero dos *Streptococcus*, sendo o *S. lactis*, *S. cremoris* e *S. lactis* subsp. *diacetylactis* os principais responsáveis pela produção de ácido láctico, aroma e sabor, além das características do coágulo nas fermentações lácticas mesófilas (KLAENHAMMER, 1984). Todos pertencem ao grupo N de Lancefield, são homofermentativos e crescem a 10°C mas não a 45°C, situando-se sua temperatura ideal em torno de 30°C (BRIGGS e NEULAND, 1952, 1953). Podem apresentar diferentes comportamentos em leite, uma vez que a capacidade de obtenção de compostos nitrogenados essenciais para o seu crescimento é diferente, obtendo-se culturas diferenciadas em rápidas ("fast") e lentas ("slow"), em função do seu desenvolvimento (LAW e KOLSTAD, 1983). São chamadas de rápidas as culturas que crescem normalmente em leite, coagulando-o após 18 horas de incubação a 21°C e de lentas, as que coagulam o leite somente após 48 horas de incubação na mesma temperatura (CITTI *et alii*, 1965; LAWRENCE *et alii*, 1976 e COGAN, 1980). As linhagens lentas não possuem, ou perderam, o sistema de proteinases sendo, então, denominadas de Prt<sup>-</sup>, ao contrário das Prt<sup>+</sup>, que contêm o sistema proteolítico (McKAY, 1983).



O *S. lactis* encontra-se no leite na forma de pares de cocos elípticos ou formando cadeias curtas. De acordo com FOSTER *et alii* (1957), essa bactéria é essencial para a fabricação de queijos e leites fermentados, auxiliando na conservação de certos produtos lácteos protéicos que contêm hidratos de carbono. Citam, ainda, que essa espécie prolifera em leite e fermenta a lactose, originando 0,8 a 1,0% de ácido láctico, sendo este quase que totalmente constituído pela forma L podendo-se, também, encontrar quantidades pequenas de ácido acético e ácido propiônico. SWARTLING (1951) e BRIGGS (1952) descrevem organismos produtores de acetoina, CO<sub>2</sub> e diacetil, similares a *S. lactis*, na maioria de suas outras características, diferindo, porém, pela sua capacidade de utilizar citratos. Estas linhagens fermentadoras de citrato receberam a denominação de *S. lactis* subsp. *diacetylactis*.

Os *S. cremoris* possuem muitas características em comum com *S. lactis*, diferenciando-se, entre outras, pela formação de cadeias longas, produção de amônia a partir de arginina, não crescimento a pH 9,2 e nem em meio contendo 4% de NaCl, velocidade de acidificação, influência no sabor e aroma do produto final e capacidade simbiótica (COLLINS *et alii*, 1950). De acordo com DAVIS (1965); LAWRENCE *et alii* (1976) e ANTUNES (1985), o *S. cremoris* é encontrado no leite cru, porém, em número inferior ao *S. lactis*. Nos fermentos lácticos, esta relação se inverte, verificando-se uma predominância do *S. cremoris*. Isto parece ocorrer devido à maior sensibilidade das células de *S. lactis* ao ataque de vírus que a destroem. Por esse

motivo e também pelo fato de que esse microrganismo não produz defeitos de amargor e de sabor de fruta em queijos, como algumas linhagens de *S. lactis*, a indústria de laticínios tem demonstrado um interesse crescente por esse microrganismo nos últimos anos (RICHARDSON *et alii*, 1983).

O processamento de queijos e de outros produtos lácticos fermentados nasceu da necessidade de se preservar o leite cru, utilizando, para tal fim, a acidificação biológica natural e empírica. Em consequência do melhoramento das qualidades higiênicas do leite, representado pela pasteurização, tornou-se necessário substituir a flora selvagem do leite, destruída durante o tratamento térmico. Esta microflora adicionada é conhecida como cultura iniciadora ("starter") ou fermento láctico.

Um fermento láctico é composto de uma ou mais linhagens pertencentes ou não ao mesmo gênero ou espécie, utilizada para inocular um produto cru ou pasteurizado, a fim de iniciar uma fermentação. Os microrganismos de queijos de massa crua e semi-cozida e de outros produtos, são os mais estudados, compreendendo os produtores de acidez, como o *S. lactis*, *S. lactis* subsp. *diacetylactis* e *S. cremoris*, e os produtores de aroma, como o *Leuconostoc cremoris*, *L. dextranicum* e *S. lactis* subsp. *diacetylactis* (LAWRENCE *et alii*, 1976; BOTTAZZI, 1979 e COGAN, 1980).

Os fermentos termófilos, utilizados no fabrico de queijos de massa cozida e iogurte são separados em duas categorias principais: (a) os fermentos naturais, de composição não bem definida, muito ácidos, compostos por *Lactobacillus bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. fermentum* além de *S. thermophilus* e alguns estreptococos fecais (BOTTAZZI, 1979 e AUCLAIR e ACCOLAS, 1983) e (b) os fermentos selecionados, de composição conhecida, compostos de uma ou várias linhagens de *S. thermophilus* e/ou lactobacilos, entre esses, *L. bulgaricus*, *L. lactis* e *L. helveticus* (AUCLAIR e ACCOLAS, 1983) e *Propionibacterium shermanii* (LAWRENCE et alii, 1976).

A principal ação dos fermentos lácticos é acidificar e coagular mais rapidamente o leite pela fermentação da lactose, convertendo-a a ácido láctico, além de seus produtos metabólicos fornecerem sabor e aroma desejáveis e característicos ao produto final (NYIENDO et alii, 1974 e SMILEY, 1980). Para que o fermento preencha esses requisitos é importante sua composição, não apenas em termos de gêneros e espécies microbianas presentes mas, também, em termos de linhagens de cada espécie. Dentro da mesma espécie podem ser encontradas linhagens com diferentes intensidades metabólicas e características bioquímicas (GORDON e SHAPTON, 1976).

Dessa forma, quando se efetua a seleção de linhagens para a composição de fermentos lácticos mesófilos deve-se considerar: (1) a capacidade de produção de ácido láctico (PEARCE, 1969 e HEAP e LAWRENCE, 1976); (2) crescimento e atividade a

diferentes temperaturas (BABEL, 1962; DUTTA *et alii*, 1972; HEAP e LAWRENCE, 1981 e DALY, 1983); (3) capacidade proteolítica adequada, sem ocorrência de amargor no produto final (LAWRENCE *et alii*, 1976; COX, 1977; MARCOS *et alii*, 1977; SHARPE, 1979; BELOVA *et alii*, 1982 e RICHARDSON, 1984); (4) resistência a bacteriófagos (COX, 1977; LAWRENCE *et alii*, 1978; HEAP e LAWRENCE, 1981; DALY, 1983 e HUGGINS, 1984); (5) promoção de transformações desejáveis durante o processo de cura (HAMMOND, 1976; COX, 1977; HEAP *et alii*, 1978 e HUGGINS, 1984); (6) compatibilidade de crescimento em associação com outras linhagens e/ou espécies (GORDON e SHAPTON, 1976 e DALY, 1983); (7) características organolépticas e tecnológicas adequadas (GARCIA, 1984); (8) não produção de substâncias inibidoras (HEAP e LAWRENCE, 1976) e (9) estabilidade das propriedades desejáveis de coagular a 22°C em 18 horas o leite reconstituído esterilizado (LAWRENCE *et alii*, 1978).

Em fins do século passado e início deste século, Storch na Dinamarca, Conn nos Estados Unidos e Weigmann na Alemanha, iniciaram o primeiro sistema de preparação de fermentos lácticos para iniciar uma fermentação. Esta prática foi imediatamente adotada pelas indústrias de queijo devido aos bons resultados apresentados (SANDINE, 1980). O desenvolvimento dos fermentos lácticos foi, assim, especialmente significativo para as indústrias de queijo, as quais sofreram um progresso notável por poderem padronizar os seus produtos, tornando-se

possível conhecer o poder acidificante e a atividade bioquímica dos microrganismos que atuam nos queijos em maturação.

Segundo COX (1977) e LAWRENCE *et alii* (1976) existem três tipos básicos de fermentos lácticos mesófilos, em relação à sua composição: (1) fermento simples ou de linhagem única, constituído de uma única linhagem de *S. cremoris* ou *S. lactis*, usado na Austrália, ou em pares na Nova Zelândia; (2) fermento de linhagens múltiplas, constituído de uma mistura definida, qualitativa e quantitativamente de, geralmente, três ou mais linhagens puras de *S. cremoris* e *S. lactis*, sendo utilizado principalmente nos Estados Unidos e (3) fermento misto, composto de linhagens de *S. cremoris*, *S. lactis*, *S. lactis* subsp. *diacetylactis* e *Leuconostoc*, em proporções variáveis e, às vezes, desconhecidas; é usado, principalmente, na Europa e América do Sul.

Vários fatores podem afetar o crescimento e a atividade do fermento láctico, tais como a temperatura de processamento, o volume do inóculo, as características genéticas da cultura, bem como a presença de inibidores naturais e adicionados ao leite (HULL, 1978). Dentre eles, os bacteriófagos constituem-se em um dos fatores mais importantes, sendo a principal causa individual da baixa produção de ácido pelos fermentos lácticos (WHITEHEAD e COX, 1935; ELLIKER, 1951; CHRISTENSEN, 1972; CHOPIN *et alii*, 1976; HULL, 1978; GASSON e DAVIES, 1980a e JARVIS, 1981). Dessa forma, os conceitos iniciais

de fermentos lácticos foram modificados, visando não só à eficiência tecnológica como à utilização de linhagens resistentes a bacteriófagos, com o objetivo de controlá-los. Uma revisão sobre esse aspecto encontra-se mais adiante neste mesmo capítulo.

### 3.2. Bacteriófagos

Os bacteriófagos são vírus que, quando atacam as bactérias, podem causar dois tipos de conseqüências: a lise da célula, causada pelos chamados fagos virulentos, ou a permanência dentro da célula hospedeira, integrado ao seu DNA; nesse caso, são chamados fagos temperados ou profagos e, este estado, de lisogenia. Um fago pode comportar-se como temperado para uma determinada linhagem hospedeira e virulento para outra; esta propriedade é determinada no hospedeiro, já que a capacidade genética para produzir a proteína repressora reside no genoma do fago (ANDERSON *et alii*, 1981).

Os bacteriófagos, na indústria, podem ser provenientes do ar, de soro infectado, de partículas de leite resultante de má higienização ou do leite cru a ser processado (WHITEHEAD, 1953 e HULL e BROOKE, 1982), podendo sobreviver à pasteurização e à secagem por calor (CHOPIN, 1980). Além disso, o próprio fermento láctico, composto por linhagens lisogênicas de bactérias lácticas possuindo um ou vários DNAs fágicos integrados ao seu cromossomo na forma de profago (BRADLEY e JONES, 1968; STADHOUDERS, 1974; OVERBY, 1976; LAWRENCE *et alii*, 1976;

HUGGINS e SANDINE, 1977; LAWRENCE, 1978; HEAP *et alii*, 1978; DAVIES e GASSON, 1981, 1983; JARVIS, 1982; CHOPIN *et alii*, 1983 e TEUBER e LEMBKE, 1983), representa a principal fonte natural de fagos virulentos.

As linhagens lisogênicas de estreptococos lácticos foram demonstradas primeiramente por REITER (1949), quando observou que três linhagens liberavam fagos espontaneamente, causando lise em uma linhagem indicadora apropriada. Mais recentemente, verificou-se que a lise em bactérias lácticas lisogênicas pode ser induzida por calor, luz ultravioleta (KEOGH e SHIMMIN, 1969; MCKAY e BALDWIN, 1973; KOSAK *et alii*, 1973; LOWRIE, 1974; PARK e MCKAY, 1975; REITER e KIRIKOVA, 1976 e HUGGINS e SANDINE, 1977) ou por mitomicina C (HUGGINS e SANDINE, 1977; SINHA, 1980 e REYROLLE *et alii*, 1982), de acordo com o que já havia sido descrito por HAYES (1968).

Uma demonstração clássica de lisogenia em *S. lactis* e *S. cremoris* foi feita por GASSON e DAVIES (1980 a) ao verificarem que variantes curados de seu profago mostraram-se ser indicadores sensíveis ao seu próprio fago temperado. Esses variantes podiam ser re-lisogenizados completando, assim, o ciclo temperado para o estado de profago. Observações similares foram feitas por GEORGHIOU *et alii* (1981), que demonstraram, inclusive, a resistência do estado de profago ao antisoro ativo contra aquele bacteriófago temperado.

Outros tipos de relações entre fagos e bactérias lácticas como, por exemplo, a pseudo-lisogenia, pelo qual um fago lítico perpetua-se em equilíbrio estável em uma população bacteriana heterogênea, composta de pelo menos uma cultura resistente a ele, dando origem freqüentemente a mutantes sensíveis, devem ser, igualmente, levadas em consideração (GRAHAM *et alii*, 1952; BARKSDALE e ARDEN, 1974; STADHOUDERS, 1975 e LIMSOWTIN e TERZAGHI, 1977).

A incidência praticamente universal da lisogenia nos estreptococos lácticos indica que as linhagens lisogênicas podem servir como um reservatório de fagos potencialmente capazes de atacar as cepas que compõem os fermentos lácticos mistos (HUGGINS e SANDINE, 1977). Dessa forma, não se deve misturar, nos fermentos lácticos, linhagens sensíveis aos fagos temperados das demais linhagens componentes do mesmo (McKAY e BALDWIN, 1973; LAWRENCE *et alii*, 1978 e DANIELL e SANDINE, 1981). Entretanto, pelo fato de faltarem linhagens indicadoras sensíveis aos fagos temperados (LAWRENCE *et alii*, 1976), chegou-se a acreditar que estes últimos são de menor importância e que não contribuem para o aparecimento de fagos virulentos durante o processamento industrial (TEUBER e LEMBKE, 1983). Esta hipótese foi reforçada após os estudos de homologia de DNA entre fagos temperados, induzidos a partir de três linhagens de *S. cremoris* e 25 (vinte e cinco) fagos líticos isolados de fábricas de queijo, verificando-se ausência de homologia genética



entre eles (JARVIS, 1984 b). Por outro lado, a alta porcentagem de linhagens indicadoras sensíveis a fagos temperados induzidos (REYROLLE *et alii*, 1982) e a estreita correlação entre os espectros de atividade de fagos temperados e virulentos (CHOPIN *et alii*, 1976) reforça o potencial dos fagos temperados como fontes de fagos líticos nas fermentações lácticas.

Tanto as bactérias como os bacteriófagos exibem considerável variabilidade genotípica e fenotípica. Alterações na resistência de estreptococos lácticos a bacteriófagos têm sido rotineiramente observadas (COLLINS, 1958, 1962; LIMSOWTIN e TERZAGHI, 1977; LIMSOWTIN *et alii*, 1978; SINHA, 1980 e SANDERS e KLAENHAMMER, 1981, 1983). Similarmente, alterações nos bacteriófagos devidas a mutações (JARVIS, 1978) ou por modificações controladas pelo hospedeiro (COLLINS, 1956; POTTER, 1970; KEOGH, 1973; SINHA, 1980; SANDERS e KLAENHAMMER, 1980 e DALY e FITZGERALD, 1982) podem alterar radicalmente a faixa de hospedeiros. Considerando a dinâmica das interações fago-hospedeiro durante as fermentações lácticas (LAWRENCE e THOMAS, 1979) pela própria dinâmica genética dos estreptococos lácticos (DAVIES e GASSON, 1981, 1983 e MCKAY, 1983), as alterações genéticas nos fagos temperados destes organismos devem ser igualmente dinâmicas, resultando, assim, em grande complexidade nas interações hospedeiro-fagos temperados ou líticos, levando ao aparecimento de uma população dominante de fagos líticos.

Os fagos dos estreptococos lácticos mesófilos *S. lactis* e *S. cremoris* têm sido os mais bem estudados, em particular nos países anglo-saxões. Estes são os fagos de fermentos lácticos utilizados na fabricação do queijo Cheddar. Por outro lado, pouco se sabe sobre os fagos de fermentos lácticos termófilos, *S. thermophilus* e diversos *Lactobacillus* utilizados na fabricação de iogurte e queijos de massa cozida (ACCOLAS *et alii*, 1980 e REINBOLD *et alii*, 1982). Além disso, os fermentos termófilos parecem ser menos sensíveis a fagos que os mesófilos (LAWRENCE, 1978 e SOZZI *et alii*, 1976); contrariamente, os fagos que atacam linhagens de *S. thermophilus* e *L. helveticus* apresentam uma alta especificidade em relação ao hospedeiro (SOZZI e MARET, 1975).

Os bacteriófagos que atacam os estreptococos lácticos têm sido intensivamente estudados quanto à sua caracterização morfológica e sorológica. Determinações das medidas e estruturas de cabeças, caudas, colares e bases desses fagos, obtidas por meio de microscopia eletrônica, demonstraram a existência de diversos tipos morfológicos (PARMELEE *et alii*, 1949; BRADLEY, 1963, 1967; HENNING *et alii*, 1968; BAUER *et alii*, 1970; KEOGH e SHIMMIN, 1974; TERZAGHI, 1976; TSANEVA, 1976; JARVIS, 1977; HULL, 1978; HEAP e JARVIS, 1980; LEMBKE *et alii*, 1980; CHOPIN e ROUSSEAU, 1983 e TEUBER e LEMBKE, 1983). Com exceção dos fagos com cabeças tubulares descritos por CHOPIN e ROUSSEAU (1983) e daqueles com caudas contrateis descritos por TIKHONENKO (1970), a maioria dos bacteriófagos lácticos possuem cabeças prolatas,

isométricas pequenas ou grandes e caudas não contrácteis (SOZZI *et alii*, 1980). Apesar dos fagos com cabeças prolatas ou isométricas causarem problemas nas fermentações lácticas (TEUBER e LEMBKE, 1983), os primeiros são, geralmente, mais virulentos que os segundos (HEAP e JARVIS, 1980).

Os grupos morfológicos dos bacteriófagos lácticos foram bem correlacionados com estudos sorológicos e de homologia de DNA-DNA (ACKERMANN, 1969; TSANEVA, 1976; HEAP e JARVIS, 1980 e JARVIS, 1977, 1978, 1984 a). Estudos também foram feitos para agrupá-los de acordo com a faixa de hospedeiros (ADAMS, 1950; BRADLEY, 1965 e CHOPIN *et alii*, 1976). Recentemente JARVIS (1984 a) estudou quatro grupos de bacteriófagos lácticos quanto à morfologia, sorologia e homologia de DNA, verificando que os grupos morfológicos estabelecidos não possuíam homologia de DNA. Com estes resultados, o autor sugeriu que estes grupos de fagos não possuem um ancestral comum e que as espécies diferentes de fagos, não foram originadas por mutação entre os grupos.

LAWRENCE (1978) e LEMBKE e TEUBER (1981), por meio de estudos sorológicos, feitos a partir de material coletado em indústrias de queijo, revelaram que o número de fagos e de culturas de estreptococos lácticos realmente diferente é baixo e que os tipos morfológicamente distintos de fagos são pouco numerosos, parecendo haver uma correlação entre a morfologia do fago e o tipo de hospedeiro. Entretanto, os grupos de bacteriófagos definidos por meio da morfologia, sorologia ou

homologia de DNA não mostram correlação com os agrupamentos baseados na faixa de hospedeiros (KEOGH e SHIMMIN, 1974; HEAP e JARVIS, 1980 e JARVIS, 1978, 1984 a).

NYIENDO *et alii* (1974) examinaram 25 fagos de estreptococos lácticos mesófilos observando que todos continham DNA de dupla fita com conteúdo de guanina-citosina variando entre 32,7% e 40%. Posteriormente, LEMBKE e TEUBER (1982) verificaram que determinados fagos do tipo prolata e isométrico, comumente presentes no soro de queijo possuíam teores de G + C entre 41% e 32%, respectivamente. O comprimento das moléculas de DNA desses fagos, determinado por eletro-micrografias ou por digestão com endonucleases de restrição, varia entre 18 e 27 megadaltons (Mdal) (KLAENHAMMER e MCKAY, 1976; DALY e FITZGERALD, 1982 e LOOF *et alii*, 1983).

Apesar das espécies e linhagens de bactérias componentes de fermentos lácticos serem suscetíveis ao ataque de bacteriófagos, não são necessariamente sensíveis às mesmas raças de fagos (CALAM, 1964; KEOGH, 1972; STADHOUDERS, 1974; LAWRENCE *et alii*, 1976; LIMSOWTIN *et alii*, 1977 e HEAP *et alii*, 1978). O estudo mais extensivo sobre os cruzamentos fago-hospedeiro em estreptococos lácticos foi feito por CHOPIN *et alii* (1976) com 132 fagos usados contra 291 linhagens. Observaram que 68,8% das linhagens ensaiadas foram sensíveis ao grupo "g3" de fagos, podendo-se concluir que a maioria das linhagens de estreptococos lácticos são suscetíveis a bacteriófagos de ampla

faixa de hospedeiros. Dessa forma, o grau de diversidade na faixa de hospedeiros dos bacteriófagos lácticos é muito maior do que o inicialmente imaginado.

A determinação de numerosos cruzamentos com fagos heterólogos que apresentam baixa eficiência de formação de placas de lise (ORAM e REITER, 1968; TERZAGHI e TERZAGHI, 1978; PEARCE, 1978; BOUSSEMAER *et alii*, 1980 e SANDERS e KLAENHAMMER, 1980) foi facilitada com o uso de preparações contendo alta concentração de fagos (LAWRENCE *et alii*, 1976 e HEAP e LAWRENCE, 1976) e, principalmente, pelo desenvolvimento de meios tamponados como o M16 (LOWRIE e PEARCE, 1971 a), triptona-extrato de levedura-ágar (KEOGH, 1980) e M17 (TERZAGHI e SANDINE, 1975). Destes, o meio M17, tamponado com  $\beta$ -glicerofosfato, tem sido o mais utilizado para ensaios de formação de placas de lise, melhorando, indubitavelmente, a detecção do desenvolvimento de fagos heterólogos nos estreptococos lácticos. Isto porque este meio, além de manter o pH acima de 5,7, deixa o elemento cálcio livre, necessário para adsorção dos fagos à parede celular microbiana.

9 Segundo SANDINE (1980), o processo de infecção dos estreptococos lácticos pelos bacteriófagos consta de quatro estágios: (a) adsorção, onde os fagos se prendem aos sítios receptores na célula hospedeira, geralmente pela cauda e (b) infecção do DNA fágico, dependentes de cálcio; (c) período latente onde, para os fagos virulentos, a capacidade biossintética da célula torna-se comprometida para a produção de DNA e proteína

do fago, os quais, posteriormente, se reunirão para formar o fago maduro; e (d) a eclosão, quando os fagos viáveis são liberados no meio através de lise das células.

A interação entre a bactéria e o fago é altamente específica (PARADA *et alii*, 1984) e depende da presença de receptores fágicos reativos localizados, em algumas linhagens, na parede da célula (ORAM e REITER, 1968) e, em outras, na membrana plasmática (ORAM, 1971 e HURST e STUBBS, 1969). Subseqüente caracterização dos receptores fágicos demonstrou serem estes de natureza lipoprotéica com componentes polipeptídicos (ORAM, 1971 e KEOGH e PETTINGILL, 1983).

O grau de adsorção dos fagos pode ser grandemente afetado pela disponibilidade de cátions mono ou bivalentes (CHERRY e WATSON, 1949 b). REITER (1956) observou que os bacteriófagos eram inibidos em meio deficiente em cálcio. Posteriormente, HARGROVE (1959) relatou que o uso de fosfato no leite impedia o crescimento de fagos nos fermentos lácticos. Os ânions fosfato seqüestram os íons cálcio, tornando-os não disponíveis aos fagos que os necessitam para injetar seu DNA na célula (WATANABE e TAKESUE, 1972). Entretanto, essas reações não são específicas para o cálcio ou qualquer outro cátion (CHERRY e WATSON, 1949 b; POTTER e NELSON, 1952; REITER e MØLLER-MADSEN, 1963 e ORAM e REITER, 1968). Outros fatores adicionais extrínsecos que podem afetar a adsorção dos fagos pelos estreptococos lácticos incluem mudanças no pH (CHERRY e WATSON, 1949 a e KEOGH e PETTINGILL, 1983) e a temperatura (KEIGH, 1973 e SANDERS e KLAENHAMMER, 1984).

De modo geral, os fagos são bem adsorvidos pelo seu hospedeiro homólogo, seguindo-se o ciclo lítico normalmente. Entretanto, vários cruzamentos entre hospedeiro e fagos heterólogos que demonstram adsorção eficiente falham no desenvolvimento do ciclo lítico (ORAM e REITER, 1968) ou apresentam baixa eficiência de formação de placas de lise (SANDERS e KLAENHAMMER, 1980, 1983). Este tipo de resposta é devido à presença de sistemas de restrição/modificação (PEARCE, 1978; BOUSSEMAER *et alii*, 1980; SANDERS e KLAENHAMMER, 1980 e DALY e FITZGERALD, 1982), a outros mecanismos de defesa conhecidos (SANDERS e KLAENHAMMER, 1983, 1984) ou, simplesmente, à impossibilidade do fago adsorvido replicar-se no hospedeiro. As alterações na especificidade adsortiva dos bacteriófagos podem ser devidas às mudanças nos hospedeiros ou nos próprios fagos, causadas por mutações ou por modificações induzidas pelo hospedeiro (COLLINS, 1958; ORAM e REITER, 1968; KEOGH, 1973; LIMSOWTIN e TERZAGHI, 1976; JARVIS, 1978 e KING *et alii*, 1983).

Já foi evidenciado, também, que alterações nas propriedades de adsorção dos estreptococos lácticos podem ser devidas, em alguns casos, à aquisição ou perda de plasmídios. Assim, SANDERS e KLAENHAMMER (1983) mostraram que a perda de um plasmídio de 30 Mdal em uma linhagem de *S. lactis* ME<sub>2</sub>, não sensível a fagos, aumentou sensivelmente a adsorção de quatro fagos heterólogos, assim como a eficiência de formação de placas de lise. Similarmente, DE VOS *et alii* (1984) verificaram que a adsorção de um fago por *S. cremoris* SL<sub>11</sub> aumentou de 5%

a 90% após a perda de um plasmídeo de 34 Mdal. O envolvimento de plasmídios nos mecanismos de defesa a fagos e nos estreptococos lácticos pode explicar, em parte, a grande variabilidade e instabilidade nas relações fago-hospedeiro comumente observadas nessas bactérias.

Seguindo-se à adsorção, o DNA do fago é injetado na célula bacteriana, ocorrendo sua multiplicação. A propagação de fagos líticos pode ser um processo rápido, com períodos latentes curtos e liberação de grande número de fagos após a lise da célula. Cada novo fago liberado poderá infectar uma nova célula sensível (BRADLEY e JONES, 1968 e OVERBY, 1976). Os períodos latentes variam de 9 a 139 minutos (ZEHREN e WHITEHEAD, 1954 e LAWRENCE *et alii*, 1976) com a maioria ocorrendo entre 40 a 50 minutos a 30°C (KEOGH, 1973).

A magnitude de eclosão é muito variável entre os estreptococos lácticos, variando de 9 a 105 partículas liberadas por célula infectada (KEOGH, 1973). Em altas temperaturas, os períodos latentes são geralmente reduzidos, porém, a eclosão pode aumentar, decrescer ou permanecer inalterada (ZEHREN e WHITEHEAD, 1954 e KEOGH, 1973). Períodos latentes curtos, ampla eclosão ou ambos são características de raças de fagos que se desenvolvem rapidamente, atingindo grandes populações no soro de queijo (ZEHREN e WHITEHEAD, 1954). Estes fagos são considerados como possuindo altos "fatores de multiplicação" (PEARCE *et alii*, 1970) determinados pelo teste de atividade com o



fermento láctico, podendo causar falha total do mesmo, ainda que presente em baixas concentrações no início do processamento de queijos (LAWRENCE *et alii*, 1976).

A multiplicação dos bacteriófagos nos estreptococos lácticos depende de vários fatores nutricionais, especificamente de eletrólitos que são ativos tanto na replicação dos fagos como na lise da célula. Assim, fosfato de potássio, cloreto de sódio e cálcio, sulfato de magnésio e acetato de sódio podem aumentar a eficiência de lise por bacteriófagos em *S. lactis*, porém, este efeito está estreitamente correlacionado com a eficiência de adsorção do fago (CHERRY e WATSON, 1949b). Contrariamente, a remoção de triptona do meio reduz a eclosão mas não altera a eficiência de adsorção do fago. Diversos estudos demonstraram que a replicação da maioria dos fagos depende de cálcio em concentrações ideais de  $2,7 \times 10^{-4}$  a  $1,7 \times 10^{-3}M$  (COLLINS *et alii*, 1950; POTTER e NELSON, 1952; ORAM e REITER, 1968 e SOZZI *et alii*, 1980), apesar do mecanismo utilizado não estar bem determinado (LAWRENCE *et alii*, 1976).

Outro fator que afeta o desenvolvimento lítico dos fagos nos estreptococos lácticos é a temperatura a qual gera, normalmente, respostas bem variadas. A maioria dos fagos possui uma temperatura ótima de replicação idêntica à ótima para crescimento da bactéria hospedeira, ou seja,  $30-32^{\circ}C$  (WHITEHEAD e COX, 1936 e SOZZI *et alii*, 1978). Entretanto, algumas vezes, temperaturas altas podem inibir a multiplicação dos fagos (KEOGH, 1973 e MULLAN *et alii*, 1981) ou aumentá-la (HUNTER,

1943; PEARCE, 1978; SANDERS e KLAENHAMMER, 1980; DANIELL e SANDINE, 1981 e HULL e BROOKE, 1982). O estímulo da alta eficiência de formação de placas de lise em cruzamentos com fagos heterólogos, normalmente de baixa eficiência, por temperaturas elevadas (PEARCE, 1978) ou por choque de calor (SANDERS e KLAENHAMMER, 1980) parece resultar da inativação fenotípica dos sistemas de restrição/modificação, levando o fago a se multiplicar em hospedeiros normalmente restritivos.

### 3.3. *Sistemas de Restrição/Modificação*

Após a entrada do DNA fágico dentro da célula, a bactéria pode permitir a sua replicação, resultando na propagação do fago, abortar a infecção nos casos em que o fago não se compatibiliza com os sistemas de replicação do hospedeiro, destruir o DNA do fago por meio de enzimas de restrição ou, em menor frequência, modificar quimicamente aquele DNA de tal forma, que ele não seja reconhecido pelas enzimas de restrição, permanecendo apto para completar seu ciclo lítico (KRÜGER e BICKLE, 1983).

O mecanismo clássico de restrição e modificação (R/M) de bacteriófagos consiste em duas atividades enzimáticas: (1) a enzima de restrição é uma endonuclease capaz de cortar o DNA fágico em sítios que não haviam sido previamente modificados e (2) a enzima de modificação é uma metilase ou glicosilase que adiciona um radical nas palíndromes, as quais se tornam, então, modificadas (MESELSON *et alii*, 1972; ARBER, 1974;

BICKLE, 1982; McCLELLAND, 1981 e YUAN, 1981).

A adaptação de fagos heterólogos pela modificação controlada pelo hospedeiro leva a um desenvolvimento lítico irrestrito no novo hospedeiro; entretanto, tais modificações são reversíveis e determinadas pelo último hospedeiro no qual o fago foi propagado, distinguindo-se, assim, de mutação (LURIA, 1953). Enquanto os sistemas de restrição e modificação constituem o principal mecanismo de defesa contra a infecção por bacteriófagos heterólogos, por outro lado, as enzimas de modificação fornecem a oportunidade de adaptação do fago em novos hospedeiros (KLAENHAMMER, 1984).

A existência de sistemas de R/M nos estreptococos lácticos já está bem estabelecida, sabendo-se, atualmente, que estão amplamente distribuídos neste gênero de bactérias, podendo existir sistemas múltiplos de R/M em uma única linhagem (COLLINS, 1956; BOYER, 1971; MESELSON *et alii*, 1972; LAWRENCE *et alii*, 1976; PEARCE, 1978; LIMSOVTIN *et alii*, 1978; SANDERS e KLAENHAMMER, 1980; BOUSSEMAER *et alii*, 1980; DALY e FITZGERALD, 1982; DAVIES e GASSON, 1981, 1983; MCKAY, 1983; TEUBER e LEMBKE, 1983 e CHOPIN *et alii*, 1984).

FITZGERALD *et alii* (1982) isolaram uma endonuclease de restrição, ScrF<sub>1</sub>, do tipo II, de seqüência específica em *S. cremoris* F. Este estudo forneceu a primeira evidência bioquímica da existência de enzimas de restrição em estreptococos lácticos. Apesar da linhagem expressar restrição e modificação

dos fagos dependentes do hospedeiro, não se sabe se a enzima ScrF<sub>1</sub> opera "in vivo" como parte do sistema de R/M da célula.

LIMSOWTIN *et alii* (1978) verificaram que a manutenção de um sistema de R/M era instável em uma linhagem de *S. cremoris* e especularam sobre uma possível localização extra-cromossômica dos genes que codificam esse sistema. Posteriormente, SANDERS e KLAENHAMMER (1980, 1981) associaram a existência de um sistema de R/M, também em *S. cremoris*, a um plasmídeo de 10 Mdal pois, os variantes que o haviam perdido replicavam o fago C<sub>2</sub> ensaiado com mais eficácia. Observaram, ainda, que a atividade de modificação foi simultaneamente perdida naqueles mutantes, demonstrando que o plasmídeo curado codificava para ambas as atividades. Uma observação similar foi feita para a atividade restritiva de *S. lactis* subsp. *diacetylactis* F7/2 por TEUBER e LEMBKE (1983). Também CHOPIN *et alii* (1984) estabeleceram que dois plasmídios, de 28 e 31 Kb cada, codificavam sistemas de R/M em *S. lactis*.

SANDERS e KLAENHAMMER (1981) verificaram, entretanto, que os mutantes que haviam perdido o plasmídeo que codificava um sistema de R/M, apesar de terem reduzidas suas atividades de restrição e modificação apresentavam, ainda, alguma restrição ao fago em estudo. Concluíram, então, que havia outros sistemas de R/M adicionais na linhagem estudada, os quais eram independentes daquele ligado ao plasmídeo curado.

A eficiência dos sistemas de R/M nos estreptococos lácticos pode ser retardada quando as condições ótimas

de crescimento ou experimentação são alteradas. Assim, LOWRIE (1974) mostrou que células de *S. cremoris* AM<sub>1</sub> em fase estacionária de crescimento foram muito mais sensíveis ao fago heterólogo de *S. cremoris* R<sub>1</sub> do que aquelas em fase logarítmica de crescimento. Da mesma forma, TERZAGHI e TERZAGHI (1978) verificaram que células mais velhas, crescidas em meio com níveis altos de lactose exclusivamente, demonstraram habilidade reduzida de restringir o desenvolvimento de fagos heterólogos. Este efeito foi atribuído parcialmente aos baixos valores de pH alcançados durante o crescimento das culturas em concentrações ilimitantes de lactose.

Temperaturas elevadas podem, igualmente, alterar a capacidade restritiva dos estreptococos lácticos durante o ataque por bacteriófagos heterólogos. Assim, PEARCE (1978), ensaiando o fago 643 contra 23 linhagens de *S. lactis* e *S. cremoris*, observou que a eficiência de plaqueamento aumentara de, pelo menos 2 log, em 5 linhagens diferentes, quando a temperatura de incubação foi alterada de 30 para 37°C. Observações similares foram feitas por SANDERS e KLAENHAMMER (1980) em relação à baixa eficiência de cruzamentos de fagos restritos em *S. cremoris* SH e *S. cremoris* 799; após aumento de temperatura na incubação das linhagens, as progênes de fagos modificados produzidas eram capazes de desenvolvimento lítico total nos hospedeiros anteriormente restritivos. MCKAY e BALDWIN (1984) demonstraram a existência de um plasmídeo de 40 Mdal em *S. lactis* subsp. *diacetylactis*, conferindo resistência a fagos

naquela cultura somente a temperaturas entre 21 e 32°C, sendo sua replicação, portanto, termossensível. Estes dados indicam que temperaturas elevadas podem ocasionar o aparecimento de uma população de fagos modificados, com capacidade de lisar os hospedeiros que antes os restringiam, por meio da perda temporária dos sistemas de R/M nessas bactérias. Dessa forma, as elevadas temperaturas utilizadas na manufatura de queijos podem contribuir diretamente para o surgimento de novas populações de fagos líticos, por meio do aumento da capacidade de replicação de fagos heterólogos em culturas que sofreram um choque térmico.

Conclui-se, a partir desses fatos, que essas bactérias possuem sistemas de defesa a bacteriófagos independentes dos sistemas clássicos de restrição e modificação, os quais são rapidamente anulados em temperaturas elevadas. KRÜGER *et alii* (1980) e KRÜGER e BICKLE (1983) observaram que a restrição e modificação fenotípica de viroses bacterianas também pode ocorrer, por um mecanismo que envolve uma modificação na proteína, e não no DNA do fago. Dessa forma, a capacidade do fago ser adsorvido por uma nova célula hospedeira é influenciada pela modificação conferida ao fago quando de sua passagem pelo hospedeiro anterior. Por outro lado, os bacteriófagos também desenvolveram diferentes mecanismos para evitar os efeitos de restrição apresentados pelas bactérias, os quais têm sido encontrados em praticamente todos os fagos já examinados (KRÜGER e BICKLE, 1983).

A expressão de sistemas múltiplos de R/M numa única linhagem de estreptococo láctico fornece-lhe uma forte barreira de proteção contra o ataque de bacteriófagos heterólogos. Conseqüentemente, a aquisição ou perda de um plasmídio que codifica sistemas de R/M podem fortificar ou enfraquecer essa barreira. Como os plasmídios são instáveis, podendo ser perdidos facilmente com o sub-cultivo contínuo, há possibilidade de se acumularem variantes deficientes quanto à capacidade restritiva, constituindo-se, esses últimos, em reservatório de hospedeiros para a replicação de fagos heterólogos (LIMSOWTIN *et alii*, 1978; SANDERS e KLAENHAMMER, 1981 e KLAENHAMMER, 1984).

#### 3.4. Controle de Bacteriófagos

Vários procedimentos têm sido utilizados na tentativa de minimizar o ataque de fagos durante as fermentações lácticas, tais como: (1) meios inibidores de fagos; (2) culturas concentradas; (3) inoculação direta nas dornas de fermentação; (4) rotação de culturas; (5) vários sistemas de fermentos lácticos; (6) mutantes resistentes a fagos e (7) linhagens insensíveis a fagos.

A prevenção da contaminação por bacteriófagos durante a preparação dos fermentos lácticos a ser utilizados na indústria é essencial, devendo ser mantida a assepsia e meios inibidores de fagos. Os primeiros recipientes especiais, para a preparação dos fermentos lácticos, que previnem a infecção fágica, foram desenvolvidos na Nova Zelândia (WHITEHEAD, 1953 e SANDINE, 1977). Não tendo sido usados em associação

com meios inibidores de fagos (LAWRENCE *et alii*, 1976 e SANDINE, 1977) e mesmo sendo, alguns deles, desenhados como sistemas fechados (WIGLEY, 1980), não estavam totalmente livres de contaminação. Conseqüentemente, uma prática comum nos Estados Unidos passou a ser a preparação dos fermentos em meios inibidores de fagos. Estes meios são preparados a partir de soro deionizado e suplementados com hidrolisados de proteína e amônia, além de fosfatos, os quais formam quelatos com cátions divalentes, especialmente o cálcio (HARGROVE *et alii*, 1961; ZOTTOLA e MARTH, 1966; HENNING *et alii*, 1965 e GULSTROM *et alii*, 1979). Quando o cálcio não está disponível, a proliferação da maioria dos bacteriófagos é inibida (COLLINS *et alii*, 1950; POTTER e NELSON, 1953; REITER e MØLLER-MADSEN, 1963). A eficácia destes tipos de meios depende do tipo e concentração do fosfato (HARGROVE *et alii*, 1961 e ZOTTOLA e MARTH, 1966), do pH do meio (HARGROVE *et alii*, 1961 e AUSAVANODOM *et alii*, 1977) e dos requisitos específicos da interação fago-hospedeiro (SOZZI *et alii*, 1980), já que nem todos os fagos requerem cálcio para efetuar seu ciclo lítico (SOZZI, 1972).

Os meios inibidores de fagos não foram adotados em todas as indústrias, especialmente na Austrália (HULL, 1983), pois podem ser inibidores para algumas culturas lácticas (CZULAK e KEOGH, 1957 e BABEL, 1958).

Dois tipos de avanços foram feitos no uso de meios inibidores de fagos para o preparo dos fermentos lácticos. O



primeiro foi a utilização do soro proveniente de processamentos adicionado de fosfatos e com controle externo de pH (AUSAVANODOM *et alii*, 1977; CHEN e RICHARDSON, 1977; RICHARDSON *et alii*, 1976 e WRIGHT e RICHARDSON, 1982). A utilização deste tipo de meio reduziu sensivelmente os custos de preparação dos fermentos. O segundo deles foi desenvolvido por SANDINE e AYRES (1981), com a utilização de um meio contendo fosfatos insolúveis em água eliminando, assim, o controle externo de pH e exibindo não só uma excelente inibição de fagos, como estimulando o crescimento e atividade das culturas lácticas.

A utilização de culturas concentradas, as quais podem ser inoculadas diretamente nas dornas de processamento, forneceu uma alternativa à preparação prévia dos fermentos e ao uso de meios inibidores de fagos. Como esses concentrados são preparados assepticamente, não há possibilidade de contaminação fágica antes de sua inoculação direta nas dornas (EDDY e RAYFIELD, 1978). Elas são congeladas e estocadas em temperaturas que variam de  $-70$  a  $-196^{\circ}\text{C}$  (PORUBCAN e SELLARS, 1979). Apesar de serem altamente ativas, os gastos exigidos para sua distribuição e estocagem em temperaturas extremamente baixas restringem sua ampla utilização nas indústrias de laticínios. Uma alternativa seria o uso de culturas concentradas liofilizadas, por serem menos caras quanto à distribuição e estocagem; entretanto, elas são menos ativas, necessitando ser reativadas através de uma série de repicagens intermediárias antes de

inoculadas nas dornas de processamento (PORUBCAN e SELLARS, 1979 e YANG e SANDINE, 1979). Atualmente, existem fermentos liofilizados superconcentrados que podem ser inoculados diretamente nas dornas, suprimindo transferências intermediárias.

WHITEHEAD (1953), concluindo que a infecção das bactérias lácticas por bacteriófagos não poderia ser totalmente eliminada durante os processamentos de queijo, tentou reduzir os níveis de fagos na indústria por meio de práticas de higiene e pelo uso de um sistema de rotação de culturas. Para tanto, utilizava linhagens aos pares durante quatro dias, partindo do princípio de que se uma delas fosse atacada por fagos, a outra poderia continuar a produção de ácido láctico. Ao final daquele período, quando a concentração de bacteriófagos específicos para aquele determinado par de culturas estivesse elevada, a utilização de um novo par a reduzia a níveis mínimos por não serem os mesmos, capazes de infectar este novo par. Este plano de ação forneceu a base para a criação do sistema misto de fermentos lácticos e os programas de rotação de culturas que são utilizados até hoje.

COLLINS (1958) sugeriu que os níveis de fagos residuais não eram suficientemente reduzidos no período de rotação, a fim de prevenir a baixa produção de ácido pelas linhagens sensíveis aos fagos líticos presentes na indústria. Esse mesmo autor (1962) propôs a substituição das linhagens sensíveis na rotação imediatamente após o aparecimento de bacteriófagos e sua substituição por uma outra linhagem não relacionada

àquele fago em questão. Entretanto, observou que, na verdade, existem muito poucas linhagens de estreptococos lácticos não relacionadas quanto à sensibilidade a fagos, disponíveis para serem utilizadas neste tipo de programa. Conseqüentemente, a eficiência e longevidade dos programas tradicionais de rotação de culturas e substituição de linhagens são severamente limitadas (CHOPIN *et alii*, 1976; LAWRENCE *et alii*, 1976 e EDDY e RAYFIELD, 1978).

Como já dito anteriormente, o problema causado pelos bacteriófagos modificou a concepção inicial dos fermentos lácticos, associando-os com programas de rotação de culturas e de substituição de linhagens sensíveis por outras resistentes a fagos. LIMSOWTIN *et alii* (1977) consideram que o desconhecimento da composição do fermento misto pode acarretar transtornos à regularidade dos padrões de qualidade dos queijos, principalmente se não forem utilizadas técnicas adequadas de manutenção das culturas nos laboratórios das fábricas de queijo. Este tipo de fermento surgiu, como já citado, a partir do programa de rotação de culturas criado por WHITEHEAD (1953). Dessa forma, sofre restrições em relação à utilização de culturas não homólogas a fagos (EDDY e RAYFIELD, 1978). Ademais, a prática de rotação de um grande número de linhagens nos fermentos mistos é de difícil execução, oferece pouca proteção contra bacteriófagos e poderia, de fato, não só promover a sua proliferação, como o aparecimento de diferentes tipos de fagos (HULL, 1978 e THUNELL *et alii*, 1981).

KEOGH (1972) cita que os fermentos simples, constituídos teoricamente por um único tipo de microrganismo, apresentam vantagens quanto à manutenção das características de qualidade dos queijos, pela facilidade no controle de seu desempenho. Na prática, esses fermentos são muito utilizados na forma pareada, o que ajuda a conferir, às culturas, resistência a bacteriófagos, sal e variações de temperatura (BOYD e TARR, 1955). O sucesso de sua utilização depende, porém, da manutenção estrita da pureza e atividade da cultura, à rigorosa assepsia em todas as etapas de sua manipulação, além da adoção de um cuidadoso programa de rotação de culturas não homólogas em relação aos fagos, por períodos não superiores a 4-6 dias (KEOGH, 1972). Entretanto, como o número dessas linhagens não homólogas a fagos é limitado e difícil de ser reconhecido, o programa de rotação usará, inevitavelmente, linhagens fago-relacionadas (LAWRENCE, 1978 e EDDY e RAYFIELD, 1978). Uma vez presentes em altos níveis na indústria, a faixa de hospedeiros desses fagos pode ser expandida por meio de mutação no fago ou por modificação controlada pelo hospedeiro (HEAP e LAWRENCE, 1976; JARVIS, 1978 e SANDERS e KLAENHAMMER, 1980, 1981).

O uso do fermento de linhagens múltiplas tem fornecido, atualmente, uma alternativa aos outros programas tradicionais de rotação de culturas (LIMSOWTIN *et alii*, 1977; RICHARDSON *et alii*, 1980; DANIELL e SANDINE, 1981 e THUNELL *et alii*, 1981). Assim que são detectados fagos líticos a qualquer

das linhagens componentes do fermento, a linhagem sensível é substituída por uma outra nova (LIMSOWTIN *et alii*, 1977) ou por um mutante resistente ao fago (RICHARDSON *et alii*, 1980 e THUNELL *et alii*, 1981). Este tipo de fermento é efetivo somente quando as linhagens selecionadas podem resistir ao ataque de bacteriófagos por um tempo suficientemente longo para que seu uso possa ser vantajoso (HEAP e LAWRENCE, 1976 e LIMSOWTIN *et alii*, 1977). A manutenção deste sistema requer um esquema de trabalho voltado muito mais a um programa de pesquisa do que de produção, tornando-se, portanto, impraticável para a maioria das indústrias.

A seleção de linhagens não relacionadas a fagos e que possuam, ainda, bom desempenho tecnológico pode ser feita por meio de um teste de atividade proposto por HEAP e LAWRENCE (1976), o qual prediz a longevidade de utilização de uma determinada linhagem em condições de processamento. Assim, as linhagens sob consideração são sujeitas a repetidos ciclos de crescimento em presença de preparações contendo alto título de fagos coletados nas próprias indústrias e utilizando-se condições de temperatura que imitam as relações tempo/temperatura encontradas durante os processamentos. Este estudo enfatizou a importância da temperatura, tipos e níveis de fagos no aparecimento de bacteriófagos líticos nas indústrias de queijo. O teste de atividade em laboratório fornece, significativamente, uma maneira de se predizer, portanto, se um fago aparecerá

rapidamente ou não, contra uma linhagem introduzida numa indústria. Posteriormente, LIMSOWTIN *et alii* (1977) formularam um fermento láctico múltiplo, composto de 06 linhagens, todas selecionadas pelo teste de atividade para resistência a fagos, o qual foi utilizado continuamente de dois a oito meses com sucesso. Após esse período, apesar da atividade não ter sido afetada, os fagos líticos apareceram contra quatro daquelas linhagens. Consequentemente, os autores recomendaram que as linhagens sensíveis deveriam ser substituídas assim que os fagos fossem detectados.

Mutantes resistentes a fagos surgem espontaneamente por meio de alterações na célula, impedindo a adsorção, infecção ou replicação de um fago específico ou um grupo relacionado a fagos. Entretanto, apesar de variantes imunes a fagos poderem ser isolados a partir de culturas lisadas em leite, estão sujeitos ao ataque por um novo fago ou perdem, gradualmente, sua resistência ao fago lítico de origem; além disso, pode ocorrer uma alteração em sua capacidade de produzir ácido láctico (WHITEHEAD, 1953; COLLINS, 1955; LIMSOWTIN e TERZAGHI, 1976; JARVIS, 1981 e KING *et alii*, 1983). Paralelamente ao fato de nem sempre ser possível isolar mutantes resistentes para todas as combinações fago-hospedeiro (LIMSOWTIN e TERZAGHI, 1976 e JARVIS, 1981), quando esses podem ser isolados, fornecem proteção à cultura láctica por pouco tempo (WHITEHEAD e COX, 1936), com raras exceções (LIMSOWTIN e TERZAGHI, 1976; JARVIS, 1981 e THUNELL *et alii*, 1981).

Segundo THOMAS e LOWRIE (1975), HULL (1977 a) e CZULAK *et alii* (1979), uma das formas de se isolar mutantes resistentes a fagos é por meio de propagação diária do fermento juntamente com amostras frescas de soro expondo, continuamente, dessa forma, as culturas aos fagos que aparecem na indústria. Essa idéia é reforçada pelo fato de existirem os chamados "fagos de leite cru", que se mostram ativos contra as culturas do fermento somente sob condições de processamento, não causando problemas durante a preparação dos fermentos em laboratório. Eles são, frequentemente, o tipo mais comum de fago encontrado nas fábricas, podendo causar o declínio da resistência dos mutantes resistentes isolados (HULL e BROOKE, 1982). De acordo com HULL (1983), a efetividade deste período depende de: (1) obtenção de amostras de soro representativas da população de fagos da fábrica e (2) o uso de um sistema de testes que incorpore fatores (condições de processamento), importantes na multiplicação de fagos, tais como temperatura, meio e natureza do fermento. Sob estas circunstâncias, a seleção constante de mutantes resistentes a fagos nos fermentos ocorre naturalmente. Entretanto, essas culturas variam consideravelmente nas taxas de produção de ácido láctico, devido ao acúmulo de variantes lentos na população (STADHOUDERS, 1975 e THOMAS e LOWRIE, 1975). Isso prejudica consideravelmente os processos atuais de processamento de queijo, sendo este método, portanto, inaceitável (LAWRENCE, 1978).

O tipo mais comum de mutação que ocasiona resistência a fagos é aquele que causa uma alteração nos sítios receptores da superfície da célula (KING *et alii*, 1983). Isto pode afetar, simultaneamente, os sistemas de transporte de carboidratos para a célula ou a produção de proteinases de superfície, explicando, assim, a perda da capacidade de produção de ácido láctico observada. Os autores demonstraram que as mutações para resistência a fagos e baixa produção de ácido láctico são eventos geneticamente independentes; as mutações para resistência ocorrem com frequência três a cinco vezes menor que aquela para baixa produção de ácido. Por outro lado, como esses mutantes resistentes e lentos são freqüentemente encontrados, o programa de isolamento dos primeiros deve incluir métodos que diferenciem os variantes lentos dos rápidos. Isto pode ser feito por meio de semeadura em meio diferencial "fast-slow" (HUGGINS e SANDINE, 1979 e THUNELL *et alii*, 1981) ou em leite-citrato-ágar (RICHARDSON *et alii*, 1980). De acordo com HULL (1983), os mutantes resistentes a fagos isolados também devem ser ensaiados quanto à capacidade de produção de ácido, por meio de testes que simulem o processamento de queijo, além da verificação de um possível desenvolvimento de aroma e sabores indesejáveis (PEARCE, 1969 e HULL, 1977 b).

Não é possível predizer, no entanto, por quanto tempo os mutantes resistentes a fagos irão assim permanecer, sob condições comerciais, podendo esse período variar de um dia a



um ano. Apesar de alguma instabilidade ser esperada, a perda da resistência tem sido um dos principais problemas, a nível de indústria (HULL, 1977 a).

### 3.5. Plasmídios e Melhoramento Genético

Muitas linhagens de estreptococos lácticos possuem plasmídios dos mais variados tamanhos (KLAENHAMMER *et alii*, 1978; LARSEN e MCKAY, 1978; KEMPLER e MCKAY, 1979 e CHOPIN e LANGELLA, 1982). Apesar do grande número de plasmídios que essas linhagens possam apresentar, muitos deles são crípticos e somente poucos têm suas funções conhecidas (DAVIES e GASSON, 1981).

A extração e determinação dos plasmídios de estreptococos lácticos foi feita, inicialmente, através de centrifugação, em gradiente de densidade, do DNA marcado radioativamente em cloreto de césio e brometo de etídio (CORDS *et alii*, 1974). Atualmente, existem técnicas mais rápidas e convenientes utilizando eletroforese em gel de agarose (MEYERS *et alii*, 1976) que foram adaptadas à detecção de plasmídios de bactérias lácticas (KLAENHAMMER *et alii*, 1978). Antes desta detecção, entretanto, há necessidade de lisar-se a célula para que o DNA possa ser removido. Diversos protocolos relacionados a este ponto foram publicados podendo-se dividi-los em dois grupos: métodos que removem a membrana celular juntamente com o DNA cromossômico por centrifugação (KLAENHAMMER *et alii*, 1978;

GASSON e DAVIES, 1980 b; PORTNOY *et alii*, 1981 e ORBERG e SANDINE, 1984) e métodos envolvendo a desnaturação do DNA cromossômico pela elevação do pH (WALSH e MCKAY, 1981 e ANDERSON e MCKAY, 1983). Estas últimas técnicas são preferíveis quando se deseja detectar plasmídios com alto peso molecular, ou seja, ultrapassando a 30 Mdal.

A maioria destas técnicas, entretanto, não permitia um grande número de extrações ao mesmo tempo. Assim, foram desenvolvidos protocolos contendo a miniaturização das mesmas podendo-se, dessa forma, realizar até 48 extrações de plasmídios num dia de trabalho (LANGELLA, 1982; YU *et alii*, 1982; GASSON, 1983; ANDERSON e MCKAY, 1983; CHOPIN *et alii*, 1984 e LeBLANC e LEE, 1984).

A biologia de plasmídios tem se tornado uma área importante de investigação nas bactérias lácticas, pois numerosas características fermentativas e metabólicas, de grande instabilidade em alguns desses organismos, estão ligadas a genes localizados em plasmídios (MCKAY, 1983), tais como: a fermentação de lactose (MCKAY e BALDWIN, 1984; MCKAY *et alii*, 1976; ANDERSON e MCKAY, 1977; KEMPLER e MCKAY, 1979; KUHL *et alii*, 1979; LeBLANC *et alii*, 1978; St. MARTIN *et alii*, 1982 e MCKAY, 1982, 1983), de galactose (LeBLANC *et alii*, 1979; PARK e MCKAY, 1982 e CROW *et alii*, 1983), de sacarose (GASSON, 1984) e de glicose, manose e xilose (LeBLANC *et alii*, 1980); a utilização de citrato (KEMPLER e MCKAY, 1979, 1981); a produção de proteínas (NOVICK, 1969; MOLSKNESS *et alii*, 1974; PEARCE *et alii*,

1974; MCKAY e BALDWIN, 1974, 1975; EFSTATHIOU e MCKAY, 1976; EXTERKATE, 1976; LARSEN e MCKAY, 1978; KLAENHAMMER *et alii*, 1978; OTTO *et alii*, 1982 e MCKAY, 1983) e de nisina e bacteriocinas (KOSAK *et alii*, 1973; FUCHS *et alii*, 1975; LeBLANC *et alii*, 1980; GEIS *et alii*, 1983, SCHERWITZ *et alii*, 1983 e DAVEY, 1984); a resistência a sais inorgânicos (EFSTATHIOU e MCKAY, 1977) e à nisina (GASSON, 1984 e MCKAY e BALDWIN, 1984) e a produção de substâncias viscosas ou propriedade "filante" (COGAN, 1980; DAVIES e GASSON, 1983 e MCKAY, 1983).

Outras características, já citadas anteriormente, mediadas por plasmídios incluem: sistemas de restrição e modificação (SANDERS e KLAENHAMMER, 1981 e CHOPIN *et alii*, 1984) e adsorção de fagos (SANDERS e KLAENHAMMER, 1983 e DE VOS *et alii*, 1984), conferindo resistência a certos bacteriófagos (MCKAY e BALDWIN, 1984). Com exceção de alguns poucos plasmídios relacionados à fermentação de lactose, os quais mostraram-se ser transmissíveis (KEMPLER e MCKAY, 1979; MCKAY *et alii*, 1980 e GASSON e DAVIES (1980 c), outros ligados à lactose e proteinase que foram transferidos por transdução (MCKAY e BALDWIN, 1974, 1976), todos os demais plasmídios associados aos estreptococos lácticos foram identificados por meio de métodos de cura. Estes últimos incluem a utilização de Nitrosguanidina (MCKAY *et alii*, 1976), de acridina laranja (KEMPLER e MCKAY, 1979), a indução de protoplastização (NOVICK *et alii*, 1980; GASSON, 1983 e CHOPIN *et alii*, 1984), a utilização de acriflavina (LARSEN e MCKAY, 1978 e GASSON, 1984) e crescimento a elevadas temperaturas (DAVEY e PEARCE, 1980).

A localização extracromossômica do DNA plasmidial codificando tantas características genéticas importantes nas bactérias lácticas faz com que as mesmas sejam herdadas e mantidas de forma muito instável. A evidência cada vez maior da associação de plasmídios com a resistência dos estreptococos lácticos a bacteriófagos fornece um mecanismo genético que explica o rápido aparecimento de variantes sensíveis nos fermentos lácticos (SANDERS e KLAENHAMMER, 1981, 1983). LAWRENCE (1978) enfatiza que os problemas de fagos nas indústrias lácticas pode resultar do acúmulo desses variantes sensíveis.

As possibilidades crescentes de manipulação destes plasmídios por técnicas de engenharia genética, levando à amplificação de genes plasmidiais por meio de isolamento de mutantes contendo um grande número de cópias dos mesmos dentro de plasmídios termoestáveis, à combinação dos diferentes locus genéticos para resistência a fagos em uma única linhagem e à estabilização do fenótipo fago-resistente pela integração dos genes de resistência a fagos no cromossomo, poderá favorecer a obtenção de linhagens de alta eficiência tecnológica e resistentes a bacteriófagos (McKAY e BALDWIN, 1984 e McKAY, 1984).

ERICKSON (1980) e DALY e FITZGERALD (1982) já haviam sugerido que os genes determinantes da produção de diferentes endonucleases de restrição deveriam ser introduzidos nos genomas das linhagens selecionadas, talvez por uma transferência de plasmídio, a fim de aumentar sua resistência aos bacteriófagos.

Dessa forma, o estudo da biologia de plasmídios nos estreptococos lácticos, assim como em outros gêneros de bactérias lácticas, tornou-se um pré-requisito para futuros programas de melhoramento genético. Os processos de conjugação e transdução já são bem conhecidos (GASSON, 1983), assim como a transformação (KONDO e MCKAY, 1982, 1984 e SIMON *et alii*, 1985), a transfecção (GEIS, 1982) e a fusão de protoplastos (GASSON, 1980) já foram relatadas em bactérias lácticas.

Manifestações genéticas nos estreptococos lácticos por meio da utilização de transposons também já foram observadas por CHOPIN *et alii* (informação pessoal) por meio da introdução de transposon Tn 916 originário de *S. faecalis* (FRANKE e CLEWELL, 1980) em *S. lactis*. Verificaram a ocorrência de inserções cromossômicas de plasmídios, sendo que uma delas conduzia à inativação dos genes de transferência de um plasmídio críptico.

Apesar destes mecanismos de transferência de genes terem ocasionado um avanço nos estudos de genética e biologia de plasmídios nestes organismos, o desenvolvimento de um sistema de transformação de plasmídios mais eficiente é vital para os estudos genéticos posteriores e para o uso da tecnologia do DNA recombinante na obtenção de linhagens melhoradas (MCKAY, 1984).

Pelo fato das bactérias lácticas não serem naturalmente passíveis de transformação, foram as dificuldades encontradas para melhorar a eficácia deste sistema que mais

limitaram a aplicação da engenharia genética neste grupo de microrganismos (GASSON e DAVIES, 1984).

O sucesso da utilização da técnica de transformação em estreptococos lácticos foi obtido com a produção e regeneração de protoplastos utilizando-se lisozima (GASSON, 1980), mutanolisina (KONDO e MCKAY, 1982) ou uma combinação de amilase e lisozima (OKAMOTO *et alii*, 1983). A primeira introdução do DNA por transformação de protoplastos em *S. lactis*, foi obtida por KONDO e MCKAY (1982) com rendimentos, entretanto, muito baixos, aproximadamente 8,5 transformantes/ $\mu\text{g}$  DNA. Posteriormente, os mesmos autores (1984) e SIMON *et alii* (1985) melhoraram estes rendimentos elevando-os à  $10^3 - 10^4$  transformantes por micrograma de DNA. Entretanto, por razões ainda inexplicáveis eles são muito inferiores quando utiliza-se DNA recombinante, permitindo clonar-se diretamente em *S. lactis* apenas os genes plasmidiais. Foi desta forma que KONDO e MCKAY (1984) clonaram um fragmento do plasmídeo pLM 2001 codificando para a assimilação de lactose e que CHOPIN (em publicação) clonou um fragmento do plasmídeo pL7 codificando para resistência à ultravioleta um mecanismo de reparo do DNA, além de estabilidade ao profago da linhagem hospedeira, ou seja, *S. lactis*. Atualmente, entretanto, MCKAY e CHOPIN (informação pessoal), independentemente, já obtiveram resultados de transformação com frequências da ordem de  $10^5$  e  $10^6 - 10^7$  transformantes/ $\mu\text{g}$  DNA, respectivamente.

Para aplicar-se as técnicas de engenharia genética a um grupo de microrganismos necessita-se, também, de vetores de clonagem adequados, ou seja, pequenos fragmentos de DNA capazes de replicarem-se, ou de integrarem-se em um replicon, portadores de um ou vários genes que codifiquem características fáceis a selecionar e dentro dos quais se inserem os genes, os quais deseja-se clonar. Este vetor servirá, em seguida, para introduzir os genes objetivados na linhagem desejada. Vários tipos de vetores são conhecidos para clonagem em *E. coli*, entre eles, plasmídios, bacteriófagos e cosmídios. Para os estreptococos, entretanto, foram descritos apenas plasmídios como vetores, especialmente o pGB 301 em *S. sanguis* (MACRINA *et alii*, 1980 e BEHNKE *et alii*, 1982). Também KONDO e MCKAY (1984) utilizaram-se desse mesmo vetor para clonar genes envolvidos no metabolismo de lactose. Já SIMON *et alii* (1985) e CHOPIN *et alii* (em publicação) utilizaram-se do vetor pHV 1301, um deletante de pAM $\beta$ <sub>1</sub> encontrado, originalmente em *S. faecalis* (CLEWELL *et alii*, 1974), codificando ainda, para resistência à eritromicina e presente em número de cópias elevado em uma linhagem de *B. subtilis*.

A clonagem de genes cromossômicos requer, portanto, não somente altos rendimentos de transformação, como passagem por um hospedeiro intermediário utilizando-se um vetor "navete". Assim, KOK *et alii* (1984) desenvolveram o vetor pGK12, capaz de se replicar em *E. coli*, *B. subtilis* e nos estreptococos lácticos. Entretanto, de acordo com os caracteres estudados,

a clonagem dos genes em um hospedeiro intermediário pode ocasionar problemas de expressão e recuperação.

O desenvolvimento das técnicas de clonagem em bactérias lácticas outras que não *S. lactis* está menos avançado. No caso de *S. cremoris*, por exemplo, SIMON *et alii* (1985) obtiveram rendimentos muito baixos, da ordem de  $4$  transformantes por micrograma de DNA recombinante. Entretanto, a evolução dos rendimentos obtidos com *S. lactis* oferece uma esperança de melhoramento para as outras bactérias lácticas também.

A clonagem em *S. lactis* das principais características de interesse tecnológico, tais como, assimilação de lactose, produção de protease e mecanismos de resistência a fagos está sendo desenvolvida por várias equipes (DAVIES e GASSON, 1984). Será possível, portanto, objetivar o melhoramento por meio de técnicas de engenharia genética, de linhagens de bactérias lácticas destinadas à utilização industrial. Neste caso, os vetores de clonagem atuais, constituídos de DNA proveniente de bactéria patogênica e carregando genes de resistência a antibióticos não serão autorizados para o melhoramento de linhagens de bactérias lácticas, as quais são consumidas pelo homem na razão de  $10^8$  a  $10^9$  células por grama de produto láctico. Uma forma de solucionar este problema seria a construção de vetores de clonagem ditos alimentares, possuindo DNA proveniente exclusivamente de bactérias lácticas (SIMON, 1984).



## 4. MATERIAL E METODOS

### 4.1. *Microorganismos utilizados*

Realizou-se, primeiramente, uma seleção mediante alguns parâmetros tecnológicos, a nível de laboratório, de estreptococos lácticos isolados, em sua maioria, a partir de leite cru, no Brasil. Estas culturas fazem parte da Coleção de Culturas Lácticas do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), sendo estes experimentos totalmente desenvolvidos naquele Instituto.

Uma parte deste trabalho foi realizada no Laboratoire de Recherches de Technologie Laitière, pertencente ao Institute National de la Recherche Agronomique (INRA), em Rennes, na França, o qual dispõe de uma coleção de, aproximadamente, 2.000 culturas lácticas e 150 bacteriófagos, todos muito bem caracterizados tecnológica e geneticamente.

Assim, neste trabalho, utilizaram-se as seguintes espécies e respectivas linhagens:

- *Streptococcus lactis*: 141, 175, 176, 177, 178, 179, 187, 188, 195, 206, 246, 261, 265, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 310, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, IL 1403, IL 408, IL 6, IL 13, IL 414, IL 562, IL 598, IL 823, IL 929, IL 920.

- *Streptococcus cremoris*: 161, 164, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 189, 192, 193, 196, 202, 203, 204, 205, 207, 208, 209, 210, 211, 222, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 250, 252, 254, 255, 257, 259, 262, 263, 268, 269, 272, 273, 307, 308, 309, 311, 312, 325, 326, IL 839, IL 835, IL 10, IL 737, IL 746.

- *Streptococcus* sp.: 96, 97, 101, 104, 105, 113, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 191, 194, 233.

- *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: 162, 165, 256, IL 561.

- *Bacillus subtilis*: MI 119 (MACRINA et alii, 1980).

- *Streptococcus sanguis* Challis: IL 1550.

As linhagens IL pertencem à coleção de culturas do INRA. Todas as outras linhagens utilizadas pertencem à Coleção de Fermentos Láticos do ITAL.

As culturas do ITAL foram mantidas inicialmente em leite RSM (item 4.5.3.) tipo Molico, Nestlé, sem coagulação, em refrigerador a 4°C. Sua ativação também era feita em leite RSM, com incubação a 30°C durante 18 horas. Posteriormente, a manutenção de todas as linhagens passou a ser feita em M17 + glicose (item 4.5.2.), sem crescimento, também em refrigerador a 4°C. Todas as culturas foram estocadas em M17 + glicose + glicerol (item 4.5.6.), juntamente com 2% de inóculo, com congelação imediata e mantidas em congelador a -40°C.

#### 4.2. *Plasmídios utilizados*

A caracterização dos plasmídios constituintes das culturas selecionadas pertencentes à coleção do ITAL foi realizada no laboratório do INRA.

Foram utilizados os seguintes plasmídios:

(a) pHV 1301 - extraído de *Bacillus subtilis* M1 119, originário do plasmídio pAM $\beta$ <sub>1</sub> e possuindo uma deficiência espontânea, obtido após transformação de células competentes da mesma cultura. Confere resistência à eritromicina (SIMON *et alii*, 1985) e possui o tamanho de 13 kb.

(b) pVA 856 - extraído de *E. coli* IL 1505 possuindo o tamanho de 9,2 Kb (MACRINA *et alii*, 1983).

(c) pVA 749Δ - extraído de *S. sanguis* Challis IL 1550 (MACRINA *et alii*, 1982), conferindo resistência à eritromicina e possuindo o tamanho de 4,9 Kb.

(d) pBR 322 - extraído de *E. coli* (BOLIVAR *et alii*, 1977), possuindo o tamanho de 4,3 Kb.

#### 4.3. Bacteriófagos utilizados

Foram utilizados os bacteriófagos 6, 8, 25, 42, 52, 66, 67, 119, 129 e 188, todos pertencentes à Coleção do INRA. Os estoques de fagos eram mantidos em 5ml de tampão Tris 0,05M contendo NaCl 0,1M juntamente com glicerol em concentração final de 15% e conservados sob congelação a -40°C.

#### 4.4. Esterilização e número de repetições

Todos os meios de cultura e algumas das soluções foram esterilizadas em autoclave a 121°C durante 15 minutos a 1 atm. As demais soluções foram esterilizadas em filtro Sartorius. A vidraria foi esterilizada em forno Pasteur a 140°C durante duas horas.

Os experimentos constaram de, pelo menos, duas repetições.

#### 4.5. Meios de cultura e soluções utilizadas

##### 4.5.1. Meio M17 (TERZAGHI e SANDINE, 1975)

Extrato de carne .....	5,0g
Polipeptona .....	5,0g
Peptona de soja .....	5,0g
Ácido ascórbico .....	0,5g
β-glicerofosfato de sódio .....	19,0g
Cloreto de magnésio 1 M .....	1,0ml
Extrato de levedura .....	2,5g
Lactose .....	5,0g
Água destilada .....	1,0l

Aqueceu-se até a dissolução, resfriou-se para 60°C, ajustou-se o pH para 7,1 e esterilizou-se em autoclave. Quando desejado sólido, adicionaram-se a este meio, 12g de Bacto-ágar Difco por litro e quando desejado semi-sólido, apenas 4,5g desse ágar foram adicionados.

##### 4.5.2. Meio M17 + Glicose

Manteve-se a mesma formulação do meio M17 original (item 4.5.1.), substituindo-se o açúcar lactose por glicose. Os meios sólidos e semi-sólidos, assim como a esterilização foram semelhantes ao anterior.

#### 4.5.3. Meio M17 + Sacarose (KONDO e MCKAY, 1982)

Para a regeneração de protoplastos, utilizou-se o meio M17 (item 4.5.1.) adicionado de sacarose com concentração final de 0,5 M.

#### 4.5.4. Meio M17 a 10%

Polipeptona .....	0,50g
Peptona de soja .....	0,50g
Extrato de levedura .....	0,25g
Extrato de carne .....	0,50g
Lactose .....	0,50g
Ácido ascórbico .....	0,05g
$\beta$ -glicerofosfato de sódio .....	1,90g
Mg SO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O 1 M .....	0,1ml
Água destilada .....	1,0l

O meio foi distribuído em tubos de ensaio de 18 x 180mm à razão de 9,0ml por tubo e esterilizado como descrito no item 4.4.

#### 4.5.5. Meio de Luria e Bertani (L.B.) (MANIATIS *et alii*, 1982)

Bacto-triptona DIFCO .....	10,0g
Bacto-extrato de levedura DIFCO .....	5,0g
NaCl .....	5,0g
Água destilada .....	1000ml

Ajustou-se o pH para 7,3 e esterilizou-se. Quando desejado sólido adicionavam-se 12g de Bacto-ágar DIFCO por

litro. Este meio foi utilizado para o crescimento de *Bacillus subtilis* MI 119, quando da extração do plasmídeo pHV 1301, sob incubação a 37°C com agitação.

#### 4.5.6. Meio M17 + Glicose + Glicerol

Ao meio M17 + Glicose (item 4.5.2.) adicionou-se glicerol com concentração final de 15%. Este meio foi utilizado para manutenção do estoque de culturas sob forma congelada a -40°C.

#### 4.5.7. Solução de RINGER (HARRIGAN e McCANCE, 1976)

Cloreto de sódio .....	2,25g
Cloreto de potássio .....	0,10g
Cloreto de cálcio hidratado .....	0,12g
Bicarbonato de sódio .....	0,05g
Água destilada .....	1,0ℓ

Dissolveram-se os sais na água, distribuiu-se a solução em frascos de 100mℓ e esterilizou-se.

#### 4.5.8. Leite RSM ("reconstituted sterile milk") para manutenção

Leite desnatado .....	14,0g
Água destilada .....	100mℓ

Este meio foi distribuído em tubos de ensaio, na quantidade de 5mℓ e esterilizado, sendo usado apenas para a manutenção da coleção de culturas em refrigerador.

#### 4.5.9. Leite RSM

Leite desnatado ..... 10,0g

Água destilada esterilizada ..... 90,0g

O leite foi pesado, dissolvido, vertido em Erlenmeyer e colocado durante 20 minutos em água em ebulição. Todo o material aqui usado foi esterilizado quando se necessitava do leite apenas pasteurizado. Nos casos onde se utilizou o leite RSM esterilizado, pode-se encontrar a devida notificação na metodologia.

#### 4.5.10. Tampão de Lise para Extração Preparativa de Plasmídios (MANIATIS *et alii*, 1982)

Foi preparada uma solução (A) constituída de glicina 0,1 M em NaCl 0,1 M. Preparou-se, também uma solução (B) constituída de tampão NaOH 0,1 M. Misturou-se uma determinada quantidade (X ml) da solução A e outra (100-X ml) da solução B, adicionando, ainda, 4% de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio). Estocou-se o tampão de lise em congelador. Para se efetuar a extração de plasmídios utilizou-se um tampão de lise com pH de 12,8, que corresponde a uma quantidade inicial da solução A igual a 24,2ml.

#### 4.5.11. Tampão de Lise (TL) (PORTNOY *et alii*, 1981)

SDS 4% em TE na quantidade desejada, pH 12,8. Distribuiu-se a solução em tubos de ensaio e estocou-se em congelador. Quando necessário, era descongelada em banho-maria a 37°C.



**4.5.12. Tampão paralisador de lise (SB) (MANIATIS *et alii*, 1982)**

Na <sub>2</sub> EDTA .....	100mM
Azul de bromofenol .....	1,5mg/ml
Sacarose .....	40%
pH 8,0	

**4.5.13. Tampão para Protoplastos (TP) (GASSON, 1980)**

Acetato de amônia .....	40mM
Acetato de magnésio .....	1mM
Sacarose .....	0,5M
pH 7,0	

**4.5.14. Tris-EDTA (TE) (MANIATIS *et alii*, 1982)**

Tris-HCl .....	50mM
Na <sub>2</sub> EDTA .....	10mM
pH 8,0	

**4.5.15. TE para diálise (MANIATIS *et alii*, 1982)**

Tris .....	10mM
Na EDTA .....	1mM
pH 8,0	

**4.5.16. Tris-EDTA-Sacarose (TES) (MANIATIS *et alii*, 1982)**

25% de sacarose em TE (item 4.5.14.) na quantidade desejada, pH 8,0.

#### 4.5.17. TERNase (MANIATIS *et alii*, 1982)

Tris .....	10mM
Na <sub>2</sub> EDTA .....	1mM
RNAse .....	10µg/ml
pH 7,5	

Aqueceu-se a solução a 100°C durante 10 min, distribuiu-se em tubos Eppendorf e estocou-se em congelador. Quando necessário, descongelou-se à temperatura ambiente.

#### 4.5.18. Tampão para extração de DNA cromossômico (MANIATIS *et alii*, 1982)

NaCl .....	150mM
Tris base .....	1mM
EDTA .....	10mM
pH 7,7	

#### 4.5.19. Sacarose-Maleato-Magnésio (SMM) (KONDO e MCKAY, 1982)

Sacarose .....	0,5 M
Maleato de sódio .....	20mM
Mg Cl <sub>2</sub> .....	20mM
pH 6,5	

#### 4.5.20. {SMM} x 2 (KONDO e MCKAY, 1982)

Sacarose .....	1 M
Maleato de sódio .....	40mM
Mg Cl <sub>2</sub> .....	40mM
pH 6,5	

#### 4.5.21. SMM + M17 (KONDO e MCKAY, 1982)

Elaborado a partir de 1 volume de {SMM} x 2 juntamente com 1 volume de {M17 + (Gli) x 4}.

#### 4.5.22. PEG 40% (KONDO E MCKAY, 1982)

PEG 3000 .....	40g
{SMM} x 2 .....	50ml
Água destilada q.s.p. ....	100ml

#### 4.5.23. Tampão para digestão com enzima de restrição (MANIATIS *et alii*, 1982)

- Tampão de baixa concentração salina ("Low-Salt buffer")

Tris-HCl .....	10mM
Mg Cl <sub>2</sub> .....	10mM
Ditiotreitol .....	1mM

pH 7,5

#### 4.5.24. Tampão para eletroforese Tris-Borato

Tris base ....	54,0g
Ácido bórico .....	27,5g
EDTA .....	0,05M

pH 8,0

O tampão assim preparado apresenta uma concentração de 5 vezes. Para ser utilizado fazia-se uma diluição de 1:10.

#### 4.5.25. Tampão de ligação (MANIATIS *et alii*, 1982)

Tris-HCl .....	660mM
Mg Cl <sub>2</sub> .....	50mM
Ditiotreitol .....	50mM
ATP .....	10mM

pH 7,5

Ao extrato plasmidial linear adicionavam-se 1/10 do tampão de ligação e 1 unidade de T<sub>4</sub> DNA ligase (Boehringer) por micrograma de DNA. A mistura era incubada durante 18 horas a 19°C.

#### 4.6. Capacidade de coagulação do leite RSM a 23°C durante 18 horas (HEAP e LAWRENCE, 1981)

Em tubos contendo 10ml de leite RSM esterilizado inoculou-se 1% das culturas a serem testadas, previamente ativadas durante 3 dias, incubando-se, a seguir, a 23°C durante 18 horas, após as quais selecionaram-se as que haviam coagulado.

#### 4.7. Teste de sensibilidade à temperatura (HEAP e LAWRENCE, 1981)

As culturas selecionadas de acordo com o procedimento descrito no item anterior foram inoculadas na quantidade de 0,1ml em tubos contendo 9,7ml de leite RSM estéril e 0,2ml de β-glicerofosfato de sódio. O inóculo foi padronizado com EDTA, pH 12,0, obtendo-se a densidade óptica a 410nm. Após incubação a 23°C durante 18 horas, mediu-se o pH das culturas,

selecionando-se as que apresentaram um pH mais baixo.

As culturas assim selecionadas foram inoculadas (2%) em tubos contendo 9,8ml de leite RSM mantidos em banho de gelo. Estes tubos foram, então, transferidos para banho-maria a 30°C e mantidos nesta temperatura durante 90 minutos. Após esse tempo, foram transferidos para temperatura de 38°C e mantidos durante 4 horas, sendo, então, resfriados rapidamente em banho de gelo e feita a leitura do pH.

#### *4.8. Método de semeadura para determinação do título de bacteriófagos (ADAMS, 1950)*

Em um tubo de ensaio esterilizado inocularam-se 0,2ml das culturas juntamente com 0,1ml do soro contendo fagos com e sem diluições e 0,05ml de CaCl<sub>2</sub> 1M. Após incubação dessa mistura durante 10 minutos a 30°C, adicionaram-se 3,0ml de M17 semi-sólido, agitou-se e verteu-se em placas de Petri contendo M17 + G1i sólido adicionado de 1ml de CaCl<sub>2</sub> 1M para cada 100ml de meio.

As placas com as duplas camadas de meio foram incubadas a 30°C e após 4 a 5 horas de incubação já se podia fazer a primeira contagem das placas líticas; a contagem final foi feita após 18 horas.

#### *4.9. Determinação da liberação espontânea de bacteriófagos*

A técnica seguida neste caso foi adaptada a partir daquelas propostas por HARRIGAN e McCANCE (1976) e HEAP e

LAWRENCE (1981). Essa técnica consistiu, basicamente, na inoculação de 0,2ml de cultura ativa em 2 tubos contendo 9,8ml (tubos-controle) e 2 com 9,7ml (tubos-teste) de leite RSM. Esse meio assim preparado foi incubado a 30°C durante 90 minutos e transferido para 38°C durante 4 horas, sendo, então, resfriado em banho de gelo e determinado o pH.

Parte da cultura contida em um dos tubos com 9,7ml foi transferida, antes da determinação da acidez, para um tubo de centrífuga estéril, ao qual adicionou-se 0,05ml de ácido láctico puro esterilizado. Após centrifugação a 3.000 r.p.m. durante 3 min, o sobrenadante foi recuperado em um tubo de ensaio estéril e guardado em refrigerador a 4°C.

Do segundo dia em diante inocularam-se, nos tubos-teste, (9,7ml), 0,2ml de cultura ativa e 0,1ml do soro coletado no dia anterior. Este procedimento foi repetido durante dez dias consecutivos, considerando-se aprovada, a cultura que não demonstrou, pela queda na acidificação, quando comparada com seu controle, uma multiplicação de fagos após um mínimo de sete repetições.

#### 4.10. Verificação de lisogenia através de indução com luz ultravioleta (U.V.)

Para indução de profagos, as bactérias lácticas foram irradiadas com luz U.V. (comprimento de onda = 247nm) seguindo-se metodologia proposta por CHOPIN *et alii* (1985), a qual será descrita a seguir.

As bactérias crescidas em 20mℓ de M17, a 30°C durante 90 min, ou seja, no início da fase exponencial de crescimento (determinada a partir de curva de crescimento feita anteriormente), foram centrifugadas a 5.000 r.p.m. durante 10 min e ressuspendidas em mesmo volume de solução de Ringer 1:4. Verteram-se 15mℓ dessa suspensão em uma placa de Petri contendo um agitador imantado, ambos estéreis. Os 5mℓ restantes foram utilizados como controle. Irradiou-se a suspensão, mantida sob constante agitação, por meio de incidência de luz U.V., durante 4 e 12 segundos, resultando numa dose de irradiação de 20 J. m<sup>2</sup> ou 60 J. m<sup>2</sup>, respectivamente, dependendo da linhagem. A intensidade da lâmpada U.V. foi medida por um radiômetro Black-Ray UVX (Ultraviolet products Inc.).

Após irradiação, pipetaram-se 10mℓ da suspensão em um tubo contendo 10mℓ de M17 + Gli dupla concentração. Desto tubo, tomaram-se 10mℓ e incubou-se a 30°C, observando se havia clareamento do meio. Em caso de clareamento, o meio era filtrado, diluído e testado pelo método de gotas contra todas as culturas lácticas brasileiras e alguns estreptococos lácticos sensíveis testadores, pertencentes à coleção do INRA. Também o tubo contendo o meio controle foi filtrado e ensaiado contra as mesmas culturas.

O crescimento e lise das células também foi acompanhado por meio de espectrofotômetro (Bonet, Maury, Jouan, France), obtendo-se valores de densidade óptica das amostras irradiadas e não irradiadas, durante incubação a 30°C.

4.11. *Titulação de bacteriófagos pela técnica de gotas (CHOPIN et alii, 1976)*

Placas de Petri contendo M17 + Gli sólido foram inundadas com 1,5ml da cultura crescida durante 18 horas a 30°C, sendo colocadas, abertas, em estufa a 37°C com ventilação, durante 30 minutos para secagem.

Gotas das diluições convenientes em M17 10% dos fagos a serem testados foram depositadas sobre as placas de Petri, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Após incubação por uma noite, a 30°C, contaram-se as placas de lise constantes em cada gota depositada. Cada mililitro de M17 10% contém aproximadamente 38 gotas, assim, a leitura de lise foi feita multiplicando-se o número de placas por 38.

4.12. *Preparação de estoques com alto título de fagos (REYROLLE et alii, 1982)*

Frascos contendo 100ml de M17 + Gli foram inoculados com 2% da cultura a ser estudada. Após incubação durante 2 horas a 30°C, adicionaram-se  $10^6$  UFP/ml (unidade formadora de placa) do fago a ser propagado, juntamente com 1ml de  $\text{CaCl}_2$  1M, continuando a incubação a 30°C. Após estabelecimento de lise, verificada pelo clareamento da solução, a mesma foi filtrada em filtro Sartorius.

Preparam-se estoques dos fagos virulentos 6 (IL 6), 8 (IL 10), 25 (IL 13), 42 (IL 414), 52 (IL 598), 66 (IL 561), 67 (IL 562), 119 (IL 737), 129 (IL 746) e 188 (IL 823).



#### 4.13. Concentração de fagos por polietileno-glicol (JARVIS, 1978)

Após estabelecimento de lise nos frascos contendo 100ml de M17 gli + 1ml de  $\text{CaCl}_2$  1M + 2% de cultura láctica, como descrito no item 4.12., pode-se também, ao invés de filtrar, centrifugar a 13.000 r.p.m., durante 10 min, com refrigeração. Ao sobrenadante recuperado adicionou-se NaCl 5M, de forma a obter uma concentração final de 0,5M, juntamente com polietileno-glicol 4.000 a dose de 10% (p/v). Deixou-se essa mistura durante uma noite a 4°C. Centrifugou-se a seguir, a 10.000 r.p.m., durante 10 min, ressuspensando-se os fagos em 5ml de tampão Tris 0,05M contendo NaCl 0,1M.

Dialisou-se contra esse tampão durante todo um dia, a 4°C. Esterilizou-se, após, por filtração.

#### 4.14. Extração de plasmídios

##### 4.14.1. Micro-método para a determinação rápida de perfis plasmidiais (PORTNOY *et alii*, 1981)

Alíquotas de 1,3ml de culturas crescidas durante 6 horas a 30°C, em M17, foram centrifugadas a 4.500 r.p.m. durante 5 minutos, a temperatura ambiente, e as células ressuspensadas em 800µl de TE. Essa suspensão celular foi novamente centrifugada a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos e as células ressuspensadas em 150µl de TE + 25% de sacarose (TES). 150µl de uma solução de lisozima a 10mg/ml em TES, preparada anteriormente,

foram adicionados seguindo-se incubação em banho-maria a 37°C durante 10 min.

Os protoplastos assim obtidos foram centrifugados a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos e recuperados em 10µl de TES e 600µl de tampão de lise (item 4.5.11.), que provocava, assim, uma desnaturação do DNA. Para uma ação completa do tampão de lise, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 20 min. A adição de 30µl de Tris-HCl 2M, pH 7,0, proporcionava uma baixa de pH entre 7,5 e 8,5, ocasionando uma renaturação do DNA plasmidial. A seguir, a adição de 160µl de NaCl 5M provocava o aparecimento de um precipitado branco de SDS juntamente com os resíduos de membrana e o DNA cromossômico. Os tubos foram colocados a 4°C durante, pelo menos, uma hora, sendo centrifugados após, durante 30 min e a 4°C a 13.000 r.p.m.

Retiraram-se 500µl do sobrenadante contendo o DNA plasmidial, transferindo-se para um novo tubo Eppendorf. Adicionaram-se-lhes 200µl de acetato de sódio 3M e 700µl de etanol absoluto deixando-se agir 30 min à temperatura ambiente. Isto provocava a precipitação do DNA plasmidial. Após centrifugação dos tubos durante 20 min a 4°C a 13.000 r.p.m., secava-se-lhes cuidadosamente e recuperava-se-lhes os precipitados em 60µl de TERNase. 30µl desse extrato foram submetidos à eletroforese.

#### 4.14.2. Extração preparativa e purificação de plasmídios (PORTNOY *et alii*, 1981)

Este método foi utilizado para preparar extratos de plasmídios a partir de 1,5l de cultura.

A cultura crescida em M17 + glicose durante 6 horas a 30°C foi centrifugada durante 10 min a 5.500 r.p.m. e as células ressuspendidas em TE sendo, após, centrifugadas durante 10 min a 6.000 r.p.m. e ressuspendidas em TES. Foram adicionados 30ml de TES contendo 10mg/ml de lisozima, deixando-se agir em banho-maria a 37°C durante 10 min. Os protoplastos assim obtidos foram recuperados por centrifugação durante 10 min a 5.000 r.p.m. e os precipitados recuperados em 8ml de TES. Adicionaram-se 125ml de tampão de lise (item 4.5.10.) deixando-se agir durante 20 min a 37°C. O pH foi ajustado a 7,5 - 8,5 por adição de 25ml de Tris-HCl 2M, pH 7,0. A seguir, adicionaram-se 40ml de NaCl 5M incubando-se a 4°C por, no mínimo, uma hora.

Eliminou-se o precipitado formado por centrifugação durante 30 min a 14.000 r.p.m. O sobrenadante foi recuperado, anotando-se o seu volume: x ml. Adicionaram-se 2x/5ml de acetato de sódio 3M centrifugando-se, a seguir, durante 30 min a 14.000 r.p.m. Adicionaram-se 7x/5ml de etanol absoluto ao sobrenadante deixando-se 30 min à temperatura ambiente. Centrifugou-se durante 15 min a 4°C a 14.000 r.p.m.

Os precipitados obtidos foram cuidadosamente secados antes de ser ressuspendidos em solução com 3,5ml de TERNase. Esses extratos foram transferidos para tubos de vidro, adicionando-se-lhes 3,5ml de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) e emulsionando-se-lhes por agitação suave. Essa emulsão foi centrifugada durante 10 min a 4.500 r.p.m. e a fase superior foi

recuperada com ajuda de uma pipeta Pasteur. O DNA foi precipitado pela adição de 0,35ml de acetato de sódio 3M, 7ml de etanol absoluto e conservado à temperatura ambiente durante 30 min. Esse precipitado foi centrifugado durante 20 min a 12.000 r.p.m. Ressuspenderam-se os precipitados em 3,5ml de TE, adicionando-se 3,5g de CsCl e 400µl de uma solução a 10mg/ml de brometo de etídio (BET), sendo centrifugados, a seguir, durante 40 h à temperatura ambiente a 103.100 r.p.m.

Por meio de incidência de luz ultravioleta (360nm) duas bandas eram visíveis. Os plasmídios foram recuperados a partir da banda inferior por punção lateral do tubo com uma seringa. Os extratos foram emulsionados em 1 volume de butanol-2 saturado com água. As duas fases formadas foram separadas por centrifugação a 5.500 r.p.m. durante 3 min. Essa extração foi repetida até o desaparecimento total da cor rosa e sendo feita ainda uma vez suplementar.

O extrato final foi dialisado contra 1 litro de TE, o qual foi mudado três vezes, sendo a primeira diálise realizada à temperatura ambiente e as seguintes a 4°C. O extrato foi conservado à temperatura de 4°C.

#### 4.15. Eletroforese em Gel de Agarose (MEYERS et alii, 1976)

Utilizou-se a técnica de eletroforese em gel de agarose para determinar o número e a massa molecular de plasmídios para avaliar a concentração de um extrato plasmidial e cromossômico.

A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Borato (item 4.5.24.). A concentração de agarose utilizada foi de 0,5% para as eletroforeses horizontais e de 1% para as eletroforeses verticais.

A agarose (High Gelling Temperature Agarose Seakem) foi misturada a 100ml do tampão de eletroforese, sendo fundida por meio de ebulição em forno de microondas durante 5 min. As amostras (geralmente 30 $\mu$ l) foram adicionadas de 5 $\mu$ l de tampão paralisador de lise (item 4.5.12.) e distribuídas nos poços do gel. A eletroforese foi efetuada por uma solução de brometo de etídio a 0,5g/ml e examinados em luz UV (300nm).

Os géis foram fotografados sob luz UV (Transilluminateur UV products), utilizando-se um aparelho Polaroid MP 3, munido de um filtro laranja e de um filtro UV, além de um filme Polaroid 667.

#### 4.16. Eletroforese bidimensional (HINTERMANN *et alii*, 1981)

Esta técnica foi utilizada a fim de se distinguir as três formas possíveis sob as quais um mesmo plasmídeo pode se apresentar em gel de agarose.

Após uma primeira eletroforese (item 4.15.), coloração com BET e fotografia do gel, a pista contendo as diferentes bandas plasmidiais a serem identificadas foi recortada e irradiada durante quatro minutos, a 30cm de distância de uma lâmpada U.V. (254nm) com intensidade de 500 erg/mm<sup>2</sup>. Essa irradiação, em presença de BET, ocasionava cortes nas formas

super-espicalada (CCC), sendo que uma parte delas tornava-se relaxada (OC), enquanto uma outra parte continuava CCC. As formas OC, se presentes inicialmente, não seriam modificadas.

A pista irradiada foi, em seguida, inclusa em um novo gel de agarose, o qual foi submetido a uma nova eletroforese, em direção perpendicular. Após esta segunda eletroforese, procedeu-se a uma nova coloração com BET e, após fotografar-se o gel, poder-se-ia distinguir uma sucessão de triângulos formados: as formas OC inicialmente presentes, as OC formadas após a irradiação e as CCC que subsistiram após a irradiação. Este teste admite que as formas fora dos triângulos seriam as formas lineares (L) de DNA plasmidial e cromossômico.

#### 4.17. *Estimativa do peso molecular dos plasmídios a partir de gel de eletroforese em agarose*

Os pesos moleculares (PM) dos plasmídios presentes nos extratos foram estimados por cálculo, utilizando-se a observação de MEYERS *et alii* (1976) segundo a qual, o logaritmo da migração relativa de uma banda de plasmídios é uma função linear do logaritmo do seu PM.

Incluiu-se no gel, juntamente com o extrato plasmidial de *S. cremoris* IL 839, o extrato plasmidial de *S. lactis* IL 1437, e os plasmídios pBR 322, pVA 749Δ e pVA 856, cujos pesos moleculares eram conhecidos.

Os pesos moleculares dos plasmídios são expressos em megadáltons (Mdal =  $10^6$  dáltons).

#### 4.18. Titulação do DNA plasmidial e cromossômico (MANIATIS et alii, 1982)

A amostra a ser determinada, assim como uma gama de diluição de uma preparação do fago  $\lambda$  a 50mg/ml (Boehringer) foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 0,5% preparado como descrito anteriormente, comparando-se, visualmente, a intensidade de fluorescência do DNA plasmidial ou cromossômico com aquela da gama etalonada estimando-se, assim, a quantidade de DNA existente na amostra.

#### 4.19. Recuperação do DNA plasmidial a partir do gel de agarose (MANIATIS et alii, 1982)

Após extração preparativa dos plasmídios de *S. cremoris* IL 839, efetuou-se a eletroforese vertical em gel de agarose durante uma noite, a 30V. Coloriu-se o gel com BET e observou-se rapidamente sob luz U.V., a fim de localizar a banda correspondente ao plasmídio pIL 21. Essa banda foi recortada e colocada dentro de um saco de diálise contendo tampão Tris Borato diluído a 1:2 e, em seguida, dentro de um recipiente para eletroforese contendo o mesmo tampão. Fez-se passar corrente elétrica de 100V durante 3 horas, a fim de eletroeluir o DNA do gel para as paredes internas do saco de diálise. Reverteu-se, a seguir, a polaridade da corrente durante 5 min para liberar o DNA das paredes do mesmo.

Abriu-se o saco e recuperou-se todo o tampão ali presente dentro de um tubo de centrífuga, lavando-o duas vezes,

com o mesmo tampão. Precipitou-se o DNA plasmidial, de acordo com método descrito no item 4.14.2. e realizou-se uma eletroforese de controle juntamente com o extrato plasmidial total, para confirmar se o DNA recuperado correspondia, realmente, ao plasmídeo pIL 21.

#### 4.20. Obtenção e regeneração de protoplastos (GASSON, 1983)

100ml da cultura de *S. cremoris* IL 839 crescida em M17 durante 16 horas a 30°C foram centrifugados durante 10 min a 6.800 r.p.m. à temperatura ambiente. Ressuspenderam-se as células em 100ml de água destilada, procedendo-se a uma nova centrifugação a 7.400 r.p.m. durante 10 min, também à temperatura ambiente. O precipitado celular foi recuperado em 10ml de tampão para protoplastos (TP), sendo seguido o procedimento descrito abaixo.

Em um mesmo tubo foram misturados 5ml da suspensão celular acima (C) juntamente com 5ml de TP. Em um segundo tubo, foram misturados 5ml da mesma suspensão juntamente com 5ml de TP + 2mg de lisozima por mililitro (P). Ambos os tubos foram incubados a 37°C durante 3 horas, sendo feitos exames em contraste de fase ao microscópio após 1, 2 e 3 horas de incubação. Após verificação da ocorrência de protoplastos, efetuou-se centrifugação a 4.250 r.p.m. durante 30 min. Os precipitados de (C) e de (P) foram ressuspensos em 10ml de TP, repetindo-se, a seguir, uma centrifugação nas mesmas condições. Os precipitados



de (C) e (P) foram recuperados em 10ml de TP e foram feitas diluições decimais aproximadas dos mesmos, também em TP, semeando-as em M17 Gli e M17 Gli + Sacarose, em placas de Petri.

Todas as placas contendo as diferentes diluições e meios foram incubadas a 30°C. Efetuou-se a marcação das colônias que cresceram após 5 e 7 dias de incubação. Foram transferidas por repicagem para M17 Gli 100 das colônias crescidas após 7 dias nas placas (P) que continham M17 Gli + Sacarose.

Os protoplastos das 100 colônias assim obtidas foram submetidos a uma micro-extração de plasmídios (item 4.14.1.), a fim de verificar se haviam perdido os plasmídios contidos na linhagem original.

#### 4.21. *Preparação de DNA plasmidial sob forma linear*

Em um tubo Eppendorf foram pipetados 100µl de DNA plasmidial com concentração de 50µg/ml, 10µl de tampão de restrição apropriado e um volume adequado da enzima de restrição Hpa II (Boehringer). Após incubação durante duas horas à temperatura de 37°C efetuou-se uma purificação do DNA através de passagens sucessivas por fenol, fenol + clorofórmio: álcool isoamílico e somente álcool isoamílico, de acordo com metodologia descrita por MANIATIS *et alii*, 1982. Adicionaram-se 44µl de acetato de sódio 3M e 970µl de etanol a 4°C. Incubou-se durante 30 minutos a -20°C e centrifugou-se durante 20 minutos a 13.000 r.p.m. O precipitado assim obtido foi seco cuidadosamente e ressuspendido no volume desejado de TE autoclavado.

#### 4.22. *Extração preparativa de DNA cromossômico (HARRIS-WARRICK et alii, 1975)*

500ml de cultura crescida em M17 + Gli durante 6 horas a 30°C foram centrifugados a 5.500 r.p.m. durante 10 minutos à temperatura ambiente. O precipitado celular foi res-suspendido em 10ml de tampão (item 4.5.18.), sendo adicionados 10mg/ml de lisozima. Após incubação à 37°C, durante 10 minutos, adicionaram-se 2ml de SDS 25% agitando-se cuidadosamente. Incubou-se em banho-maria a 60°C durante 15 minutos adicionando-se, a seguir, 10mg de pronase por mililitro. Procedeu-se a nova incubação a 50°C até se observar o clareamento da solução, resfriando-se, a seguir, em gelo. Agitou-se essa mistura em vortex à velocidade máxima durante 30 segundos, procedendo-se, em seguida, a uma desproteíntização com fenol e álcool isoamílico e centrifugação a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos. Ao sobrenadante recuperado adicionaram-se 3,5mg/ml de cloreto de césio e 400µl de brometo de etídio (BET) a 10mg/ml, procedendo-se, a seguir, como descrito no item 4.14.2.

#### 4.23. *Digestão parcial do DNA cromossômico por endonucleases de restrição*

Em tubos Eppendorf foram adicionados 4µl de uma solução de DNA cromossômico de IL 839, possuindo a concentração de 400µg por mililitro, 96µl do tampão de restrição "low-salt" (item 4.5.23.) e 5µl de diversas diluições da enzima Hpa II. Essas diluições continham 2, 1, 0,5, 0,25, 0,12, 0,06, 0,03 e 0 U.I. de Hpa II.

Os tubos foram incubados durante 1 hora a 37°C, após a qual retiravam-se 2µl, adicionavam-se 20µl de TE e 5µl de SB (item 4.5.12.) e procedia-se à eletroforese horizontal em gel de agarose (item 4.15.) durante 16 horas a 30V, juntamente com o DNA do fago λ digerido por H<sup>ind</sup> III (MURRAY e MURRAY, 1975). Dessa forma, determinava-se qual a quantidade ideal de Hpa II que efetuasse a digestão parcial do cromossomo.

Para se obter uma grande quantidade de cromossomo parcialmente digerido, o procedimento seguido era o mesmo, alterando-se, apenas, as quantidades iniciais do DNA, assim como dos demais reagentes.

#### 4.24. Centrifugação em gradiente de sacarose

O DNA cromossômico obtido após digestão parcial com Hpa II era purificado por fenol:clorofórmio, de acordo com metodologia descrita por MANIATIS *et alii* (1982). Recuperava-se o DNA precipitado em 500µl de TE, aquecia-se a 60°C durante 10 min, resfriava-se a 20°C e colocava-se em um tubo com gradiente em densidade de sacarose (10 a 40% p/v).

O tubo com o gradiente foi recuperado, utilizando-se pipeta Gilson da seguinte forma: 9 bandas de densidades decrescentes foram depositadas em 3 x 167µl de tampão (NaCl 1M, Tris 20mM e EDTA 5mM, pH 8,0) contendo 40%, 36,2%, 32,5%, 28,75%, 25%, 21,25%, 17,5%, 13,75% e 10% de sacarose. O volume total do tubo continha 4,5ml de sacarose juntamente com 0,5ml do DNA cromossômico.

Centrifugou-se a 28.000 r.p.m., a 20°C durante 16 a 18 horas. Frações de 100µl foram coletadas e examinadas (uma em cada três frações) em eletroforese. Para esta última foram utilizados 1,5µl de cada fração aos quais adicionavam-se 20µl de TE e 10µl de SB.

#### 4.25. Formação do DNA recombinante

Para a construção do DNA recombinante, em um tubo Eppendorf foram colocados: 50µl do vetor pVA 749Δ digerido por Hpa II (item 4.21.), 14µl do DNA cromossômico de IL 839 parcialmente digerido por Hpa II (item 4.23. e 4.24.) e 376µl de água estéril. Aqueceu-se durante 5 min a 56°C e resfriou-se a 20°C. Adicionaram-se 50µl de tampão de ligação (item 4.5.25.) e 10µl da enzima T4 DNA ligase. Incubou-se a 19°C durante 18 horas e efetuou-se uma eletroforese de controle contendo 10µl das misturas, antes e depois da ligação, juntamente com o DNA do fago λ digerido por Hind III, para confirmar se a ligação havia ocorrido.

O restante do DNA recombinante foi dialisado em TE, precipitado com etanol e ressuspendido em 100µl de TE.

#### 4.26. Transformação de protoplastos (SIMON *et alii*, 1985)

18ml de cultura de *S. lactis* IL 1403 crescida em M17 durante 1 a 1,5 horas a 30°C, ou seja, no início de sua fase de crescimento exponencial, foram centrifugados durante 10 min a 6.000 r.p.m. à temperatura ambiente. As células foram

lavadas com água destilada e esterilizada e ressuspendidas 5,2ml de SMM + M17 (item 4.5.21.), juntamente com 20mg/ml de lisozima comercial AFILACT preparada anteriormente. As células se transformaram em protoplastos durante incubação a 37°C por 2 horas. A mistura foi centrifugada a 5.000 r.p.m. durante 10 min. Os protoplastos assim formados foram lavados em 5,2ml de SMM + M17 e recuperados em 650µl da mesma solução. A ocorrência de protoplastização foi verificada em microscópio com contraste de fase.

Uma vez observada e confirmada a protoplastização efetuou-se o seguinte procedimento: aos 650µl da solução contendo os protoplastos, adicionaram-se 100µl do DNA transformante ou 5µl de água (controle 1) ou somente 5µl do vetor pVA 749Δ (controle 2) e a mesma quantidade de SMM dupla concentração. Os tubos foram incubados durante 10 min à temperatura ambiente, após os quais adicionaram-se 2ml de PEG 40% (item 4.5.22.). Efetuou-se nova incubação durante 20 min à temperatura ambiente, adicionando-se, a seguir, 6,5ml de SMM + M17.

Os tubos sofreram centrifugação a 5.000 r.p.m. durante 10 min, sendo os protoplastos recuperados em 1,3ml de M17 Gli + Sacarose 0,5M. Incubaram-se-lhes durante 2 horas a 30°C para que o DNA introduzido se exprimisse antes de serem semeadas, segundo diluições apropriadas em TP (item 4.5.13.), em M17 Gli + Sacarose 0,5M, adicionado ou não do agente seletivo, no caso, 5µg de eritromicina por mililitro.

Todas as placas contendo as diferentes diluições e meios foram incubadas a 30°C durante 7 dias, para permitir uma regeneração completa dos protoplastos. Após este período, foram transferidas para M17 Gli as colônias crescidas nas placas que continham M17 Gli + Sacarose + agente seletivo e que tinham sido semeadas com diluições da mistura que continha o DNA transformante.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Testes tecnológicos efetuados com estreptococos lácticos pertencentes à Coleção de Culturas Lácticas do ITAL

#### 5.1.1. Capacidade de coagulação do leite RSM a 23°C durante 18 horas

Segundo LAWRENCE *et alii* (1976), um dos primeiros critérios de seleção de bactérias lácticas mesófilas, utilizados internacionalmente, é a capacidade dessas bactérias coagularem o leite desnatado reconstituído dentro de 18 horas a 22-23°C. HEAP e LAWRENCE (1981) consideram que não são interessantes, do ponto de vista tecnológico, culturas que não coagulem o leite naquelas condições.

Apesar da caracterização tecnológica não ter sido o objetivo principal do presente trabalho, foi realizado este e mais alguns outros testes tecnológicos com culturas mesófilas pertencentes à coleção de culturas lácticas do ITAL, a fim de iniciar um processo de seleção.

Os resultados obtidos, sumarizados na Tabela I, evidenciaram que, de 124 culturas ensaiadas, apenas 17 não cresceram a 23°C, após 18 horas de incubação em leite RSM esterilizado. Segundo CITTI *et alii* (1965), LAWRENCE *et alii* (1976), BOTAZZI (1979) e COGAN (1980), as culturas que não conseguem coagular o leite nessas condições são consideradas lentas, sendo este, inclusive, um dos métodos para diferenciá-las também, quanto a este aspecto.

De acordo com as observações de COX (1977), as 107 culturas que se desenvolveram bem a 23°C são, a princípio, consideradas boas para a utilização como fermento, visto que têm menores chances de apresentar perda de sua capacidade acidificante.

Algumas das culturas selecionadas por meio deste método, foram utilizadas nos testes tecnológicos seguintes totalizando 124. Estas incluem algumas culturas que não cresceram a 23°C durante 18 horas, mas que posteriormente tiveram seu perfil de plasmídios determinado (item 5.2.).



TABELA 1. Resultados da capacidade de coagulação do leite RSM após incubação a 23°C durante 18 horas.

Cultura Nº	Coagulação	Cultura Nº	Coagulação	Cultura Nº	Coagulação
16	+	195	+	284	+
96	-	196	+	285	+
97	+	202	-	286	+
100	+	203	+	287	+
101	+	204	+	288	+
104	+	205	-	289	+
105	-	206	-	290	+
141	+	207	+	291	+
161	+	208	+	292	+
162	-	209	+	293	+
163	+	210	+	294	+
164	-	211	+	295	+
165	+	222	+	296	+
166	+	224	+	297	+
167	+	226	+	298	+
168	+	227	+	299	+
169	+	228	+	300	+
170	+	229	+	301	+
171	+	230	+	302	+
172	+	231	+	303	+
173	+	246	+	304	+
174	+	247	-	305	+
175	+	250	+	306	+
176	+	252	+	307	+
177	+	254	+	308	+
178	-	255	+	309	+
179	+	256	+	310	+
180	-	257	+	311	+
181	+	259	+	312	+
182	+	261	+	313	+
183	+	262	+	314	+
184	+	263	+	315	+
185	+	265	+	316	+
186	-	268	+	317	+
187	-	269	+	318	+
188	+	272	-	319	+
189	-	273	+	320	+
191	-	279	+	321	+
192	+	280	+	322	+
193	+	281	+	323	+
194	-	282	+	324	-
		283	+		

### 5.1.2. Teste de sensibilidade à temperatura

A capacidade de produzir certa quantidade de ácido durante o processo de fabricação é um fator muito importante na seleção de culturas lácticas. Para este fim, foram elaborados vários testes de atividade que relacionem, de forma geral, a nível de laboratório, a produção de ácido durante o processamento, tendo em vista a dificuldade prática de se basear todas as linhagens isoladas por meio da fabricação de queijo (BABEL, 1955; SOZZI, 1973; STADHOUDERS e HASSING, 1972; GUDKOV *et alii*, 1980 e HEAP e LAWRENCE, 1981).

Segundo BABEL (1962) e SPECK (1982) deve-se considerar, nestes testes, o tipo de tratamento térmico sofrido pelo leite, já que substâncias inibidoras e estimulantes podem ser destruídas ou formadas durante o aquecimento. Geralmente recomenda-se, para o teste de atividade, a temperatura de 30°C por estar próxima da temperatura em que a produção de ácido é normalmente maior (COX, 1977 e INTERNATIONAL DAIRY FERMENTATION, 1982). GARCIA (1984) considera que esse valor é adequado, quando as temperaturas de cozimento são inferiores a 35°C, porém, em queijos onde a temperatura excede esse valor durante a fabricação, é desejável utilizar no teste condições de temperatura de acordo com aquelas empregadas na prática, uma vez que as bactérias lácticas diferem grandemente na sua resistência às temperaturas de cozimento (BABEL, 1962 e DUTTA *et alii*, 1972).

No processamento de muitos queijos de massa cozida e semi-cozida, como o tipo Prato, é importante que o fermento produza as condições necessárias para que as reações químicas essenciais tenham seqüência, resultando na liberação de precursores do aroma, devido à quebra enzimica dos componentes do leite, bem como num baixo pH, que regula a velocidade das reações e um reduzido Eh que mantém compostos como o metanotiol na sua forma reduzida (LEGG, 1973 e COX, 1977).

O desenvolvimento do fermento láctico ainda tem sido relacionado ao aparecimento de sabor amargo em queijos, devendo-se fazer, dessa forma, uma avaliação do teor de peptídeos amargos formados durante o crescimento em leite (KLIMOVSKII *et alii*, 1973 e BELOVA *et alii*, 1982). O sabor amargo resulta, basicamente, da ação de proteinases sobre proteínas específicas, tanto oriundas do fermento como do coalho. MARCOS *et alii* (1977) consideram importante a determinação da atividade proteolítica na seleção de fermentos para a indústria.

HEAP *et alii* (1978) consideram como não originárias de amargor, as cepas que não se multiplicam rapidamente a 37-38°C, mas que apresentam bom crescimento a 35°C ou menos. Dessa forma, estimou-se a atividade acidificante dos estreptococos lácticos pertencentes à coleção do ITAL, já ensaiados no item anterior. Utilizou-se a técnica descrita no item 4.7., incubando-os em diferentes temperaturas, as quais simulam as condições de fabricação dos queijos de massa semi-cozida. Esses resultados estão sumarizados na Tabela II.

TABELA II. Efeito da temperatura de incubação na capacidade acidificante.

Cultura Nº	pH após incubação		Cultura Nº	pH após incubação	
	5 horas a 30°C	90 min a 30°C e 4 h a 38°C		5 horas a 30°C	90 min a 30°C e 4 h a 38°C
16	4,20	4,78	183	5,50	4,98
96	6,40	6,37	184	5,70	4,95
97	4,95	4,46	185	6,00	4,87
100	5,35	5,42	188	5,00	4,61
101	5,70	5,40	192	5,80	4,79
104	5,40	5,49	193	5,10	4,83
105	5,50	5,95	195	5,40	4,84
141	5,00	5,22	196	5,15	4,84
161	6,50	6,28	203	5,10	4,83
162	6,35	5,85	204	5,00	4,84
163	5,50	4,74	206	6,50	6,30
165	6,50	4,98	207	4,80	4,84
166	5,00	5,03	208	5,20	4,82
167	5,00	4,92	209	5,10	4,82
168	4,75	4,66	210	6,60	4,61
169	4,95	4,96	211	5,20	4,75
170	5,00	4,95	222	6,50	4,88
171	5,10	4,95	224	6,45	5,00
172	4,70	4,42	225	4,95	4,98
173	6,4	4,75	226	5,25	4,90
174	5,05	4,61	227	5,10	4,78
175	6,40	4,60	228	5,45	4,88
176	5,50	4,87	229	6,50	4,76
177	5,40	4,83	230	5,10	4,99
178	6,40	6,4	232	6,60	4,85
179	5,00	4,70	246	5,40	4,82
181	5,20	5,05	250	6,00	4,52
182	5,30	4,44	252	5,15	4,50

...Continua...

TABELA II. Continuação.

Cultura Nº	pH após incubação		Cultura Nº	pH após incubação	
	5 horas a 30°C	90 min a 30°C e 4 h a 38°C		5 horas a 30°C	90 min a 30°C e 4 h a 38°C
254	4,90	4,80	296	4,80	4,86
255	5,90	4,97	297	5,00	4,98
256	5,70	4,98	298	5,00	4,90
257	5,00	4,90	299	5,15	4,97
259	6,50	4,67	300	5,00	4,87
261	4,75	4,56	301	5,20	5,21
262	4,00	4,55	302	4,95	5,15
263	5,50	4,88	303	6,50	5,36
265	5,20	4,59	304	6,55	5,17
268	5,30	5,35	305	5,00	5,31
269	6,35	5,41	306	4,90	5,28
273	6,20	4,52	307	4,85	5,15
279	5,35	4,55	308	6,40	5,18
280	5,20	4,71	309	6,40	5,36
281	4,90	4,88	310	6,30	5,28
282	4,90	4,95	311	5,40	5,74
283	5,00	5,06	312	6,35	5,41
284	4,85	4,92	313	5,25	5,15
285	4,90	4,92	314	5,25	5,12
286	5,00	4,96	315	5,80	5,01
287	4,90	5,03	316	5,35	5,19
288	5,00	5,05	317	4,90	5,27
289	4,95	4,92	318	6,50	4,98
290	4,90	4,93	319	5,25	5,16
291	5,00	4,94	320	6,35	5,39
292	5,00	4,90	321	4,80	5,34
293	5,00	4,91	322	4,80	5,22
294	5,00	4,87	323	6,50	5,23
295	5,00	4,91	324	6,60	5,24

O valor do pH das linhagens 161 e 301 foi tomado como padrão para caracterização de culturas tipo lentas e rápidas, respectivamente (HEAP e LAWRENCE, 1976). Isso significa que a cultura 161 acidifica o leite, porém, a cultura 301 o faz mais rapidamente quando a temperatura é aumentada para 38°C.

Verifica-se pela Tabela II, que a grande maioria das culturas são do tipo rápidas, já que os valores de pH situaram-se abaixo de 6,50 e 6,28, pHs da cultura 161 após incubação a 30°C durante 5 horas e 90 min a 30°C + 4 horas a 38°C. As linhagens lentas apresentam essa característica por não possuírem, ou terem perdido, o sistema de proteinase, sendo, então, denominadas de Prt<sup>-</sup>, enquanto as que mantêm aquele sistema são Prt<sup>+</sup> (McKAY, 1983).

Os resultados obtidos foram semelhantes aos verificados por GARCIA (1984) observando-se, para a maioria das culturas, uma melhor acidificação após incubação a 30°C durante 90 min e, em seguida, 4 horas a 38°C.

Atualmente, as culturas Prt<sup>-</sup> têm recebido atenção especial no campo laticínista internacional, chegando mesmo a ser indicadas como culturas preferenciais na fabricação de queijos, devido a três características vantajosas que apresentam: redução do potencial de amargor, maior resistência a bacteriófagos e maior rendimento do produto (LAWRENCE *et alii*, 1976; COGAN, 1980; McKAY, 1983 e HUGGINS, 1984). ANTUNES (1985) discute que o potencial para a utilização de misturas apropriadas de Prt<sup>-</sup> e Prt<sup>+</sup> pode ser mais desejável e oferecer algumas

vantagens adicionais, como melhor controle do desenvolvimento de sabor e aroma e aumento de rendimento. Dessa forma, seria necessário ensaiar composições de fermentos contendo culturas rápidas e lentas, apresentadas na Tabela II, acompanhando a maturação do queijo processado para se poder fazer uma seleção dessas culturas.

### 5.1.3. Teste de liberação espontânea de bacteriófagos

HULL e BROOKE (1982) mostram um aumento na replicação de fagos do leite cru nos testes de atividade conduzidos a 35°C, tendo ocorrido pouco desenvolvimento a 30°C. Indubitavelmente, temperaturas elevadas encontradas durante o processamento de queijo podem incrementar a replicação de fagos em algumas linhagens que previnem ou restringem o desenvolvimento lítico em temperaturas mais baixas. Assim, linhagens que não favorecem a replicação de fagos heterólogos em temperaturas elevadas podem, de fato, ser mais desejáveis de incorporação em fermentos lácticos.

O teste de atividade proposto por HEAP e LAWRENCE (1976, 1981) prediz a longevidade de uma determinada linhagem em condições de processamento. Assim, as 124 linhagens em estudo foram sujeitas a repetidos ciclos de crescimento em presença de amostras de "soros" (meio filtrado) provenientes de seu próprio crescimento no dia anterior. Utilizaram-se, ainda, condições de tempo e temperatura que imitam aquelas encontradas durante os processamentos (item 4.9.).

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que as culturas 166 e 280 não são adequadas para serem usadas em fermentos simples ou mistos, pelo fato de terem liberado bacteriófagos, espontaneamente, após o 7º e 5º dia de atividade respectivamente. Isto é evidenciado pelo aumento do pH, situando-se próximo ou acima do pH do controle, não mais ocorrendo acidificação. As Figuras 1 e 2 sumarizam esses resultados. As demais culturas ensaiadas, entretanto, poderiam ser utilizadas para aquele fim, no que diz respeito à liberação espontânea de fagos.

Este teste deve ser complementado com o de indução de profagos através de agentes mutagênicos, para que se possa afirmar que as outras culturas não ocasionariam problemas de bacteriófagos às demais linhagens componentes de um fermento láctico.

#### *5.2. Perfil de plasmídios de estreptococos lácticos pertencentes à coleção do ITAL*

Os plasmídios de 58 culturas de estreptococos lácticos provenientes da coleção do ITAL foram extraídos segundo metodologia descrita no item 4.14.1.

Os resultados obtidos confirmam o valor do método utilizado para a identificação de plasmídios de linhagens de estreptococos lácticos. Ademais, permite estabelecer comparações entre os diferentes perfis, como já havia sido descrito por CHOPIN e LANGELLA (1982), para plasmídios de 60 linhagens



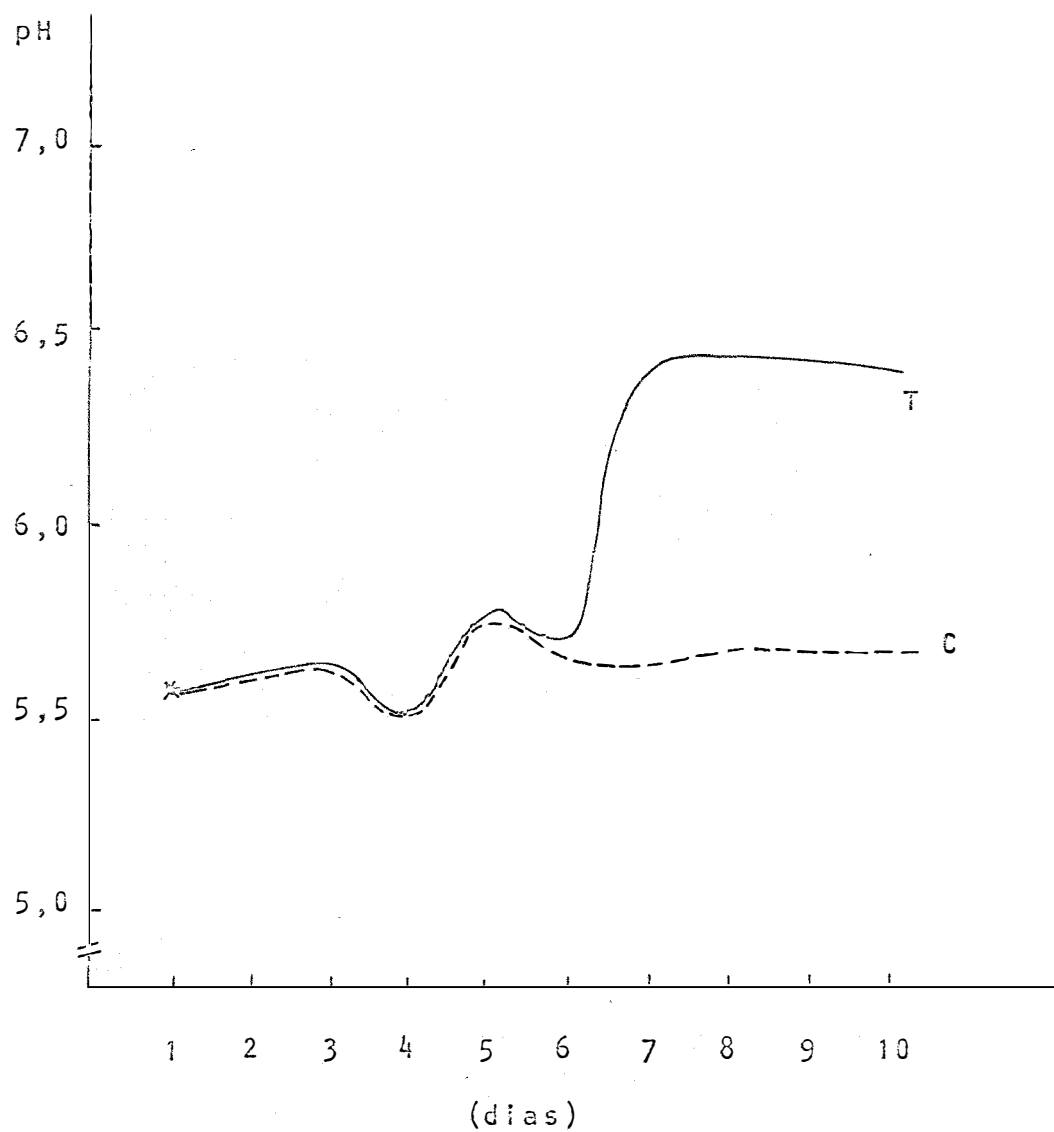


FIGURA 1. Curvas de atividade da cultura 166 com liberação espontânea de fagos, sendo C = tubos-controle e T = tu bos-teste.

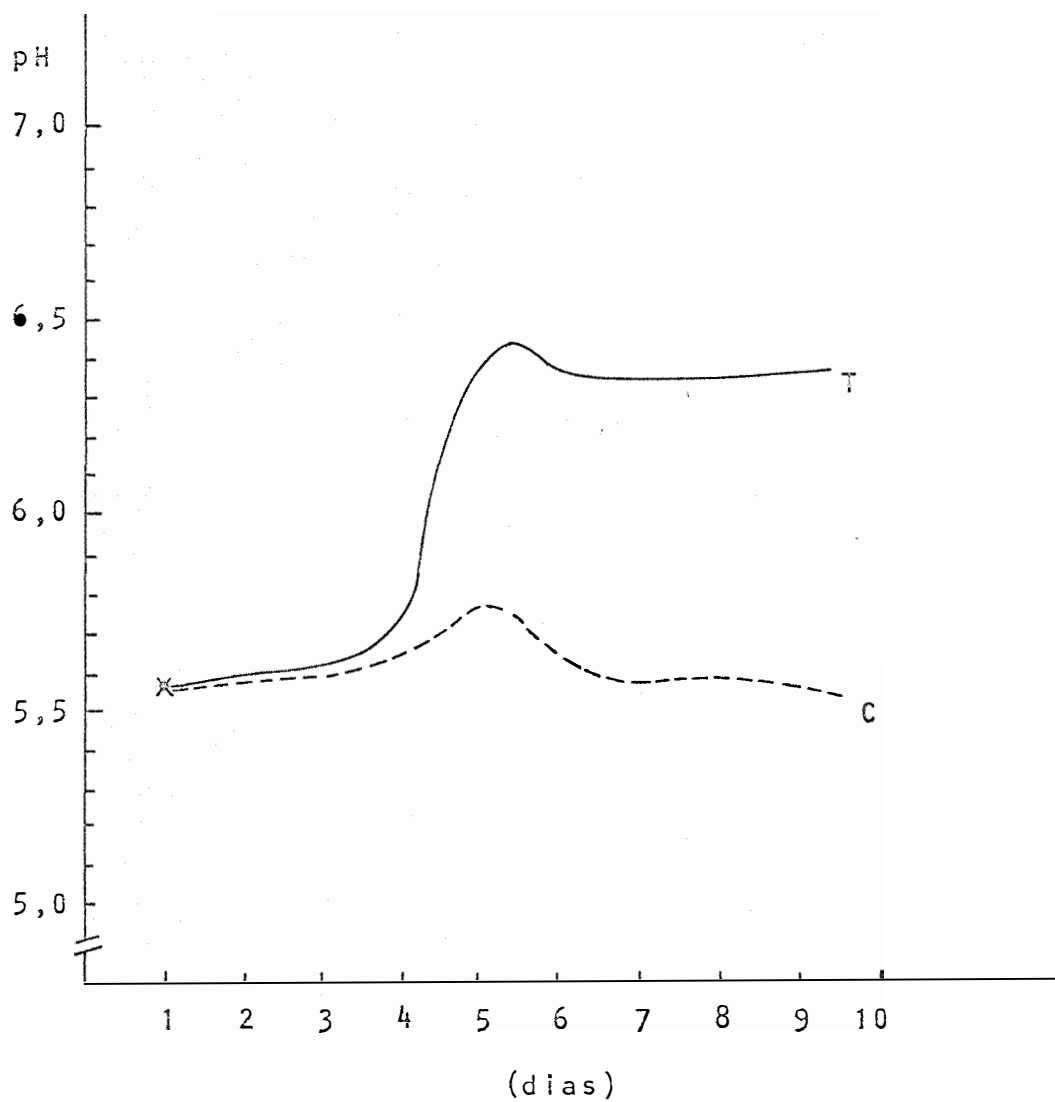


FIGURA 2. Curvas de atividade da cultura 280 com liberação espontânea de fagos, sendo C = tubos-controle e T = tubos-teste.

extraídos pelo método de GASSON e DAVIES (1980 c).

Pelos resultados expostos nas Figuras 3 e 4, 21 culturas apresentaram perfis de plasmídios distintos, sendo que seu número, por cultura, variou de um a onze (linhagem 308). Estes números são inferiores aos descritos por DAVIES *et alii*, (1981), os quais encontraram até 14 plasmídios em algumas culturas. CHOPIN e LANGELLA (1982) discutem que, talvez, nem todas essas 14 bandas encontradas representem, realmente, plasmídios diferentes pois, segundo a técnica de extração utilizada, um mesmo plasmídio pode ter seu ácido nucléico presente no extrato sob diferentes formas, ou seja, super-espíraladas, relaxadas e lineares, as quais resultam em bandas distintas após eletroforese. No presente caso, desde que foi utilizada uma técnica de extração alcalina, a qual resulta, raramente, em formas relaxadas, pode-se pensar que todas as 11 bandas observadas, no caso da cultura 308, correspondem inequivocamente a plasmídios, ou seja, a formas super-espíraladas.

Observam, igualmente, analogias no conteúdo de plasmídios de 43 culturas, cujos tipos estão representados na Figura 5. Duas culturas (179 e 320) apresentaram o perfil de plasmídios do tipo A; cinco delas (280, 313, 316, 317 e 319), o perfil do tipo B; vinte e sete (141, 16, 318, 321, 323, 324 e 281 a 301), o perfil do tipo C; três culturas (303, 305 e 306) o perfil do tipo D; três culturas (175, 178 e 206), o perfil do tipo E e outras três (167, 168 e 169), o perfil plasmidial do tipo F.

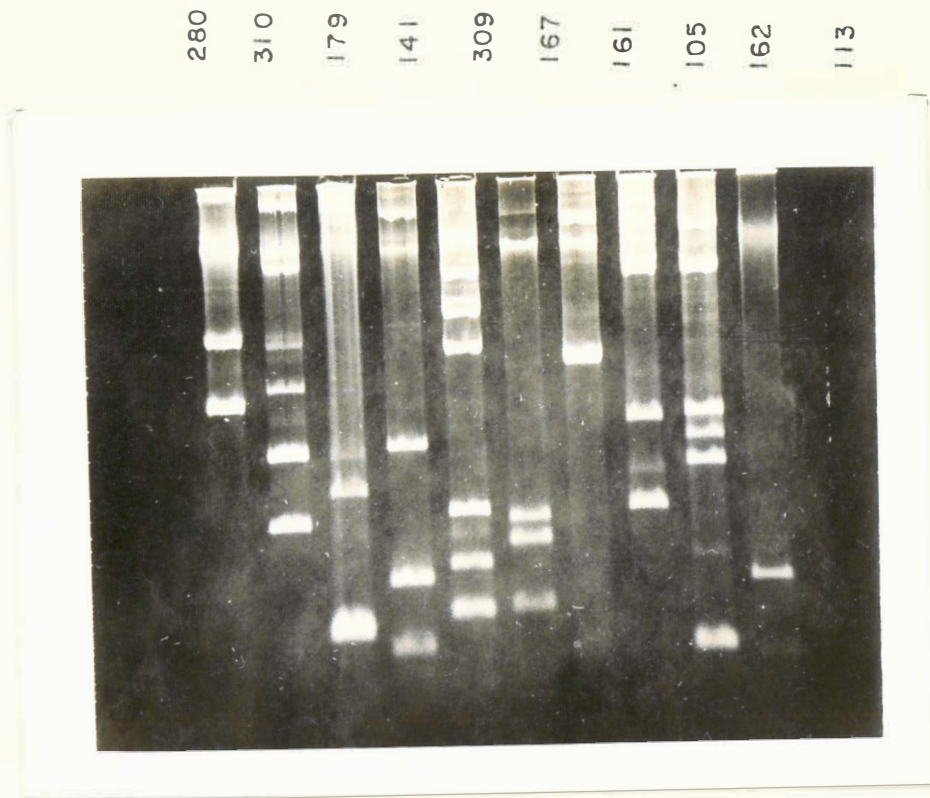


FIGURA 3. Diferentes perfis de plasmídios de linhagens de estreptococos lácticos da coleção do ITAL.

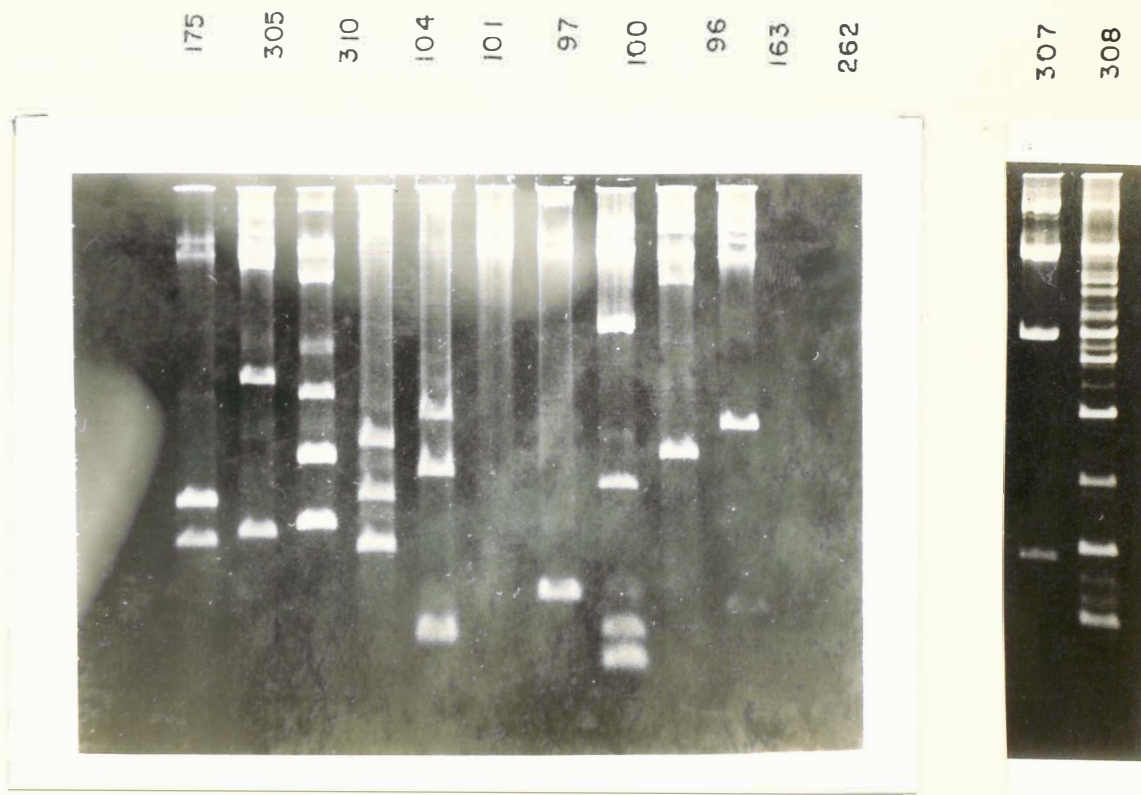


FIGURA 4. Diferentes perfis de plasmídios de linhagens de estreptococos lácticos da coleção do ITAL.

A freqüência de plasmídios análogos foi aproximadamente de 1/3, ou seja, a mesma encontrada por PECHMANN e TEUBER (1980) com 51 culturas. Já DAVIES *et alii* (1981) encontraram apenas 4 linhagens com perfis análogos, dentre um grande número de culturas, sendo que as demais apresentavam perfis de plasmídios variados e específicos. Entretanto, esses autores verificaram que as 4 linhagens idênticas derivavam de uma mesma cultura de origem, evidenciando, portanto, que a utilização de perfis de plasmídios era um excelente método para reconhecer diferentes linhagens. YU *et alii* (1983) concluíram, igualmente, que perfis de plasmídios tão diferentes e específicos para cada organismo poderiam ser utilizados na identificação das diversas culturas lácticas.

Este fato também foi comprovado no presente trabalho, já que as culturas possuindo o perfil tipo E (Figura 5) são oriundas de uma mesma cultura, assim como aquelas de números 281 a 300, perfil tipo C, também são provenientes de uma única cultura de origem.

Dessa forma, o conhecimento do perfil de plasmídios das culturas lácticas pertencentes à coleção do ITAL é de extrema importância, pois muitas delas foram isoladas de soros provenientes de processamentos de diferentes indústrias e, conseqüentemente, de fermentos comerciais que podem ser idênticos.

De acordo com CHOPIN e LANGELLA (1982), a analogia de perfis de plasmídios não é surpreendente, podendo-se supor que as pequenas diferenças observadas nos perfis de algumas

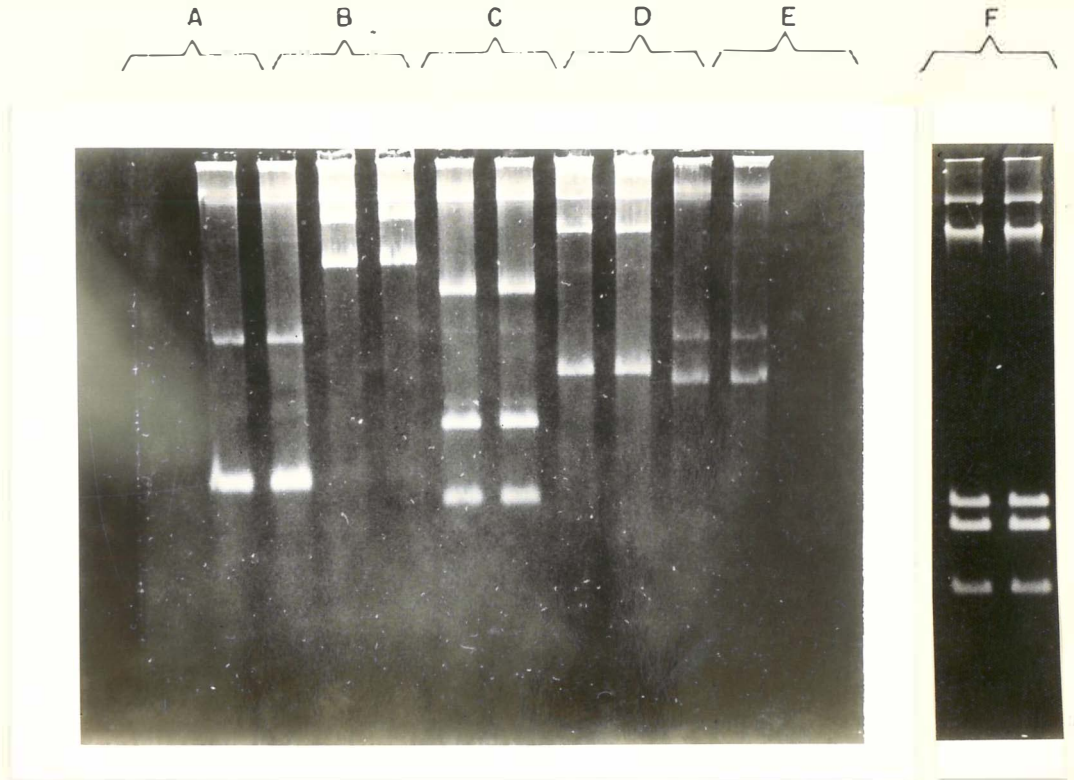


FIGURA 5. Perfis de plasmídios idênticos de linhagens de estreptococos lácticos da coleção do ITAL.

linhagens que estudaram, resultem de variações nas pressões de seleção exercidas sobre elas, durante sua passagem nas diversas coleções.

Para complementar a informação sobre linhagens possuindo perfis análogos, há necessidade de se testar a sua sensibilidade a bacteriófagos virulentos, estudo este que foi realizado e cuja discussão encontra-se no próximo item deste trabalho.

### 5.3. *Tipagem e nível de sensibilidade de estreptococos lácticos da coleção do ITAL a fagos virulentos pertencentes à coleção do INRA*

Um dos métodos utilizados no controle de bacteriófagos na indústria é a utilização de rotação de culturas que não sejam fago-relacionadas (LAWRENCE e PEARCE, 1972 e KEOGH, 1972). Para tanto, há necessidade de se conhecer a sensibilidade das bactérias aos fagos, ou seja, realizar a sua tipagem. A aplicação do método de tipagem é grandemente facilitada, se forem estabelecidos grupos de linhagens que não apresentem o mesmo padrão de sensibilidade aos fagos utilizados para a tipagem, assim como a escolha de linhagens e de fagos de cada grupo que permitam uma rápida classificação, tanto de um novo fago, como de uma nova linhagem isolada (CHOPIN *et alii*, 1976). Neste sentido, vários tipos de agrupamentos de fagos possuindo reações líticas similares foram criados (NICHOLS e HOYLE, 1949; HENNING *et alii*, 1968; LEMBKE *et alii*, 1972 e ENGEL *et alii*, 1975) e complementados com estudos sorológicos dos fagos



(NICHOLS e HOYLE, 1949; WILKOWSKE *et alii*, 1954 e ENGEL *et alii*, 1975).

CHOPIN *et alii* (1976) montaram um sistema de agrupamento de fagos, segundo sua ação lítica, assim como um outro de estreptococos lácticos baseado na sua sensibilidade aos bacteriófagos virulentos. As 21 linhagens de estreptococos lácticos da coleção do ITAL, que apresentaram perfis distintos de plasmídios foram ensaiadas contra 10 bacteriófagos representativos de 6 grupos líticos definidos por aqueles autores e pertencentes à coleção do INRA. A Tabela III resume os resultados obtidos.

Observou-se que 47,6% das linhagens testadas foram sensíveis a um ou vários fagos virulentos, pertencentes aos grupos líticos g1 (4,7%), g2 (19%) e g3 (23,8%). Não se obtiveram resultados positivos de sensibilidade aos demais fagos ensaiados pertencentes aos grupos g4 (fago 25), g5 (fago 119) e g6 (fago 42). Por outro lado, as demais linhagens ensaiadas (52,4%) mostraram-se resistentes a fagos de todos os 6 grupos líticos; essa percentagem foi maior que aquela de 10% observada por NICHOLS e HOYLE (1949), e a de 31% obtida por HENNING *et alii* (1968). Estes últimos autores consideram que a ausência de fagos ativos contra 31% das linhagens que testaram era devida ao fato das mesmas terem vindo de outras regiões e, portanto, não terem sido usadas nas fábricas onde os fagos tinham sido isolados. Isto pode adequar-se ao caso presente, já que a maioria das culturas era proveniente do Brasil e todos os

TABELA III. Sensibilidade de estreptococos lácticos brasileiros aos fagos virulentos da coleção do INRA.

Cultura Nº	Nº fago					
	8 (g1)*	6 (g2)*	52 (g3)*	66 (g3)	67 (g3)	188 (g3)
168	+					
307		+				
309		+				
310				+	+	+
105						+
162				+	+	+
179			+			
163					+	+
16		+				
262		+				

\* g1, g2, g3 = Grupos líticos.

fagos isolados em indústrias de laticínios da França. Entretanto, CHOPIN *et alii* (1976) consideram que as linhagens resistentes obtidas poderiam ser sensíveis a um pequeno número de fagos raros ainda não isolados, lisogênicas para a maioria delas ou mutantes resistentes a fagos.

Os resultados obtidos com as culturas lácticas brasileiras confirmam aqueles de CHOPIN *et alii* (1976), quanto ao grupo lítico  $g_3$ , tendo-se verificado, também, que a maioria das linhagens foi sensível a fagos deste grupo, os quais agiram, na maioria dos casos, sobre duas ou mais linhagens de estreptococos lácticos.

As 10 culturas lácticas que mostraram-se sensíveis aos fagos virulentos, não apresentaram, porém, o mesmo nível de sensibilidade. Assim, segundo a cultura indicadora utilizada, a linhagem a ser classificada ou a cultura normal de propagação do fago. O número de fagos obtidos não foi o mesmo. Estes resultados estão representados pelos diferentes valores de capacidade de multiplicação dos fagos (eop) na Tabela IV.

Obtiveram-se, portanto, dois grupos de resultados: (1) culturas apresentando igual sensibilidade a um determinado fago quanto à sua cultura de propagação (eop = 1), por exemplo, as linhagens 168, 179 e 163 em relação às linhagens de propagação IL 10 (fago 8), IL 598 (fago 52), IL 562 (fago 67) e IL 823 (fago 188) e 2 culturas apresentando sensibilidade menor que as linhagens de propagação dos respectivos fagos, por exemplo, as linhagens 307, 309, 16, 262, 310, 105 e 162 em

TABELA IV. Nível de sensibilidade dos estreptococos lácticos brasileiros aos fagos virulentos da coleção do INRA.

Cultura Nº	Eficiência de multiplicação dos fagos (*)					
	8	6	52	66	67	188
168	1					
307		$3,0 \times 10^{-6}$				
309		$1,3 \times 10^{-7}$				
310				$5,7 \times 10^{-4}$	$7,3 \times 10^{-6}$	$3,2 \times 10^{-4}$
105						$1,1 \times 10^{-5}$
162				$2,7 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-3}$
179			1			
163					1	1
16		$1,4 \times 10^{-5}$				
262		$1,5 \times 10^{-5}$				

\* Eficiência de multiplicação =  $\frac{\text{nº de fagos multiplicados sobre a cultura brasileira a ser classificada}}{\text{nº de fagos multiplicados sobre a cultura de propagação}}$

relação às linhagens de propagação IL 10 (fago 8), IL 6 (fago 6), IL 1403 (fago 66), IL 562 (fago 67) e IL 823 (fago 188), respectivamente. Para este último grupo, tentou-se identificar o mecanismo de resistência presente naquelas culturas.

De posse dos resultados de nível de sensibilidade aos fagos, procurou-se verificar se culturas que apresentavam perfis de plasmídios análogos possuíam igualmente, a mesma sensibilidade aos fagos líticos. Os dados obtidos foram positivos, determinando-se, dessa forma, que a eficiência de multiplicação do fago 8 sobre as culturas 166, 167 e 169 era idêntica à da cultura 168, assim como a cultura 320 foi idêntica à obtida sobre a cultura 179. Esses resultados confirmam aqueles obtidos por CHOPIN e LANGELLA (1982) quanto à semelhança de perfis de plasmídios e espectro de sensibilidade idêntico a fagos virulentos. Confirmou-se, também, que o sistema proposto por CHOPIN *et alii* (1976) pode ser aplicado para estreptococos lácticos provenientes de outras regiões, tendo-se podido classificar as linhagens sensíveis da seguinte forma: grupo G1: linhagem 168; grupo G2: linhagens 307, 309, 16 e 262 e grupo G3: linhagens 310, 105, 162, 179 e 163.

#### 5.4. Determinação de mecanismos de resistência a bacteriófagos em estreptococos lácticos da coleção do ITAL

Verificou-se que as linhagens 310, 162, 105, 307, 16, 262 e 309, apresentaram um mecanismo de resistência a determinados

fagos virulentos ensaiados (Tabela IV). Estabeleceu-se posteriormente a existência de um mecanismo de restrição e modificação na linhagem 310 em relação aos fagos 66, 67 e 188 de 4 log e na linhagem 162 em relação ao fago 66 de 2 log. Estes resultados estão sumarizados nas Tabelas V e VI.

Após propagação do fago 66 sobre a linhagem IL 1403, obteve-se um título de somente 1 fago sobre  $10^4$  sobre a linhagem 310. Desde que este fago foi propagado sobre 310, ele foi modificado, podendo, então, multiplicar-se bem sobre esta linhagem. Quando se propagou novamente sobre IL 1403, ele perdeu a modificação adquirida sobre a linhagem 310, a qual passou a restringi-lo como anteriormente.

Desta forma, estabeleceu-se que a resistência da linhagem 310 aos fagos 188 e 67 era devida a este mecanismo de R/M (resultados não apresentados).

Observou-se, entretanto, que as placas de lise formadas pelo fago 188 sobre as culturas 162 e 105 correspondiam a fagos mutantes. Assim, o fago 188 modificado quando de sua propagação na linhagem 105 conserva esta modificação mesmo após sua multiplicação em IL 823. Não se trata, portanto, de uma modificação controlada pelo hospedeiro, mas de uma mutação (LURIA, 1953). Um exemplo destes resultados está representado na Tabela VII.

TABELA V. Evidência de um mecanismo de restrição/modificação presente na linhagem 310, ativa contra o fago 66.

Linhagem hospedeira	Eficiência de multiplicação do <sup>a/</sup>		
	Fago 66 (IL 1403) <sup>b/</sup>	Fago 66 (IL 1403-310) <sup>c/</sup>	Fago 66 (IL 1403-310 IL 1403) <sup>d/</sup>
IL 1403	1	1	1
310	$5,7 \times 10^{-4}$	1	$3,2 \times 10^{-4}$

a/ Eficiência de multiplicação =  $\frac{\text{n}^\circ \text{ de fagos multiplicados sobre a cultura estudada}}{\text{n}^\circ \text{ de fagos multiplicados sobre a cultura de propagação}}$

b/ O fago 66 foi propagado sobre a linhagem IL 1403.

c/ O fago 66 foi propagado sucessivamente sobre as linhagens IL 1403 e 310.

d/ O fago 66 foi propagado sucessivamente sobre as linhagens IL 1403 e 310 e IL 1403.

TABELA VI. Evidência de um mecanismo de restrição/modificação presente na linhagem 162, ativa contra o fago 66.

Linhagem hospedeira	Eficiência de multiplicação do <sup>a/</sup>		
	Fago 66 (IL 1403) <sup>b/</sup>	Fago 66 (IL 1403-162) <sup>c/</sup>	Fago 66 (IL 1403-162 IL 1403) <sup>d/</sup>
IL 1403	1	1	1
162	$2,9 \times 10^{-2}$	1	$2,7 \times 10^{-2}$

a/ Eficiência de multiplicação =  $\frac{\text{n}^\circ \text{ de fagos multiplicados sobre a cultura estudada}}{\text{n}^\circ \text{ de fagos multiplicados sobre a cultura de propagação}}$

b/ O fago 66 foi propagado sobre a linhagem IL 1403.

c/ O fago 66 foi propagado sucessivamente sobre as linhagens IL 1403 e 162.

d/ O fago 66 foi propagado sucessivamente sobre as linhagens IL 1403 e 162 e IL 1403.



TABELA VII. Evidência de um mecanismo de resistência apresentado pela linhagem 105, devido a mutações sofridas pelo fago 188.

Linhagem hospedeira	Eficiência de multiplicação do <sup>a/</sup>		
	Fago 188 (IL 823) <sup>b/</sup>	Fago 188 (IL 823-105) <sup>c/</sup>	Fago 188 (IL 823-105 IL 823) <sup>d/</sup>
IL 823	1	$1,6 \times 10^{-5}$	1
105	$4,5 \times 10^{-6}$	1	1

a/ Eficiência de multiplicação =  $\frac{\text{n}^\circ \text{ de fagos multiplicados sobre a cultura estudada}}{\text{n}^\circ \text{ de fagos multiplicados sobre a cultura de propagação}}$

b/ O fago 188 foi propagado sobre a linhagem IL 823.

c/ O fago 188 foi propagado sucessivamente sobre as linhagens IL 823 e 105.

d/ O fago 188 foi propagado sucessivamente sobre as linhagens IL 823 e 105 e IL 823.

O fago 6 causa provavelmente uma lisogenização nas culturas 307, 309, 16 e 262, as quais também apresentaram resistência ao mesmo, assim como o fago 67 sobre a linhagem 162 (Tabela IV). Isto foi evidenciado pela impossibilidade de multiplicação deste fago naquelas culturas, além do aspecto morfológico das placas de lise que apresentaram, ou seja, placas muito pequenas e turvas, de difícil visualização e contagem. Entretanto, não houve tempo hábil para que se pudesse comprovar devidamente este fenômeno.

#### 5.5. Verificação de lisogenia em estreptococos da coleção do IIAL por meio de indução com luz ultravioleta (U.V.)

Os estreptococos lácticos podem ser uma possível fonte de fagos temperados, responsáveis por falhas na produção de ácido láctico, durante o processamento de queijos (LAWRENCE *et alii*, 1976). A incidência praticamente universal de lisogenia nessas bactérias indica que as mesmas podem servir como um reservatório de fagos potencialmente capazes de atacar as cepas que compõem os fermentos lácticos mistos (HUGGINS e SANDI-NE, 1977). Além disso, ALLEN *et alii* (1963) demonstraram que podem ocorrer trocas genéticas mediadas por fagos nas bactérias

láticas, sendo este um outro fator que pode contribuir para aumentar a variabilidade das linhagens correspondentes daqueles fermentos. Por este motivo, o conhecimento de linhagens lisogênicas e indicadoras, que possibilitem a multiplicação dos fagos liberados, é muito importante na escolha de uma cultura componente de um fermento láctico.

Com este propósito, os 21 estreptococos lácticos que apresentaram diferentes perfis de plasmídios, foram submetidos à irradiação por meio de luz U.V. (item 4.10.), no intuito de induzir seus possíveis profagos ao ciclo lítico. Foram utilizadas dosagens de  $20 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$  para induzir 17 culturas e  $60 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$  para as restantes, pois nem todas as culturas puderam ser induzidas com a primeira dose.

A indução dos fagos temperados foi evidenciada por um clareamento no meio de cultura contendo as culturas induzidas, em comparação com as testemunhas não submetidas à irradiação U.V. Este clareamento ainda foi comprovado por medidas contínuas em espectrofotômetro da densidade óptica (D.O.) de todas as culturas. Esses resultados são exemplificados pela Figura 6.

Todas as culturas sofreram lise entre 90 minutos e 4 horas após o choque com U.V. Procurou-se, em seguida, culturas sensíveis aos fagos temperados presentes nos lisados obtidos. Para tanto, testou-se a ação destes últimos sobre as mesmas 21 culturas estudadas e também sobre 6 culturas da coleção

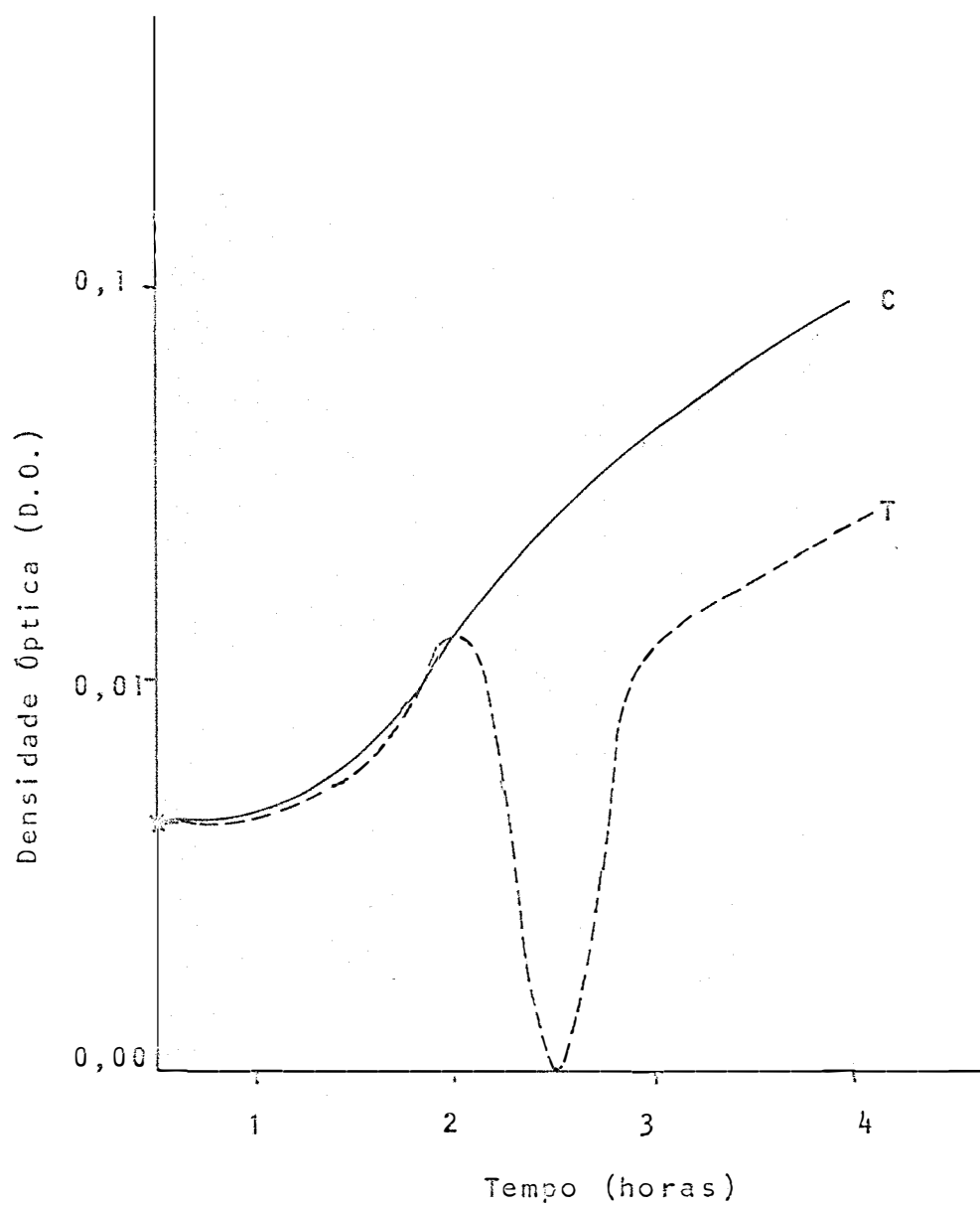


FIGURA 6. Evolução da densidade óptica da linhagem 96 com (T) e sem (C) indução com uma dose de  $20 \text{ J.m}^{-2}$  de radiação U.V.

do INRA, que já haviam se revelado boas indicadoras no curso de um trabalho anterior (REYROLLE *et al.*, 1982). Os resultados obtidos estão sumariados na Tabela VIII.

TABELA VIII. Espectro lítico de fagos liberados após indução com luz ultravioleta.

Linhagem indicadora	Linhagem induzida		
	179	175	310
IL 929		+++	
IL 920	+++	++	
IL 408		+++	+
96		+	
163	+++		
310		++	
97		+	

+  $10^1$  a  $10^2$  UFP/ml (Unidade Formadora de Placa)  
 ++  $10^2$  a  $10^4$  UFP/ml  
 +++  $10^4$  a  $10^6$  UFP/ml

Os lisados obtidos foram, inicialmente, testados pelo método de gotas, contra todas as 21 culturas em estudo, além de 6 culturas indicadoras pertencentes aos grupos G1, G2 e

G3 (REYROLLE *et alii*, 1982). Quando obtinha-se um resultado positivo testava-se, posteriormente, as mesmas culturas e lisados pelo método de plaqueamento em dupla camada. Dessa forma, obtve-se o título das unidades formadoras de placa de lise (UFP) de cada lisado, para cada linhagem sensível.

As culturas indicadoras do INRA, pertencentes aos Grupos 1 e 2, não mostraram sensibilidade a nenhum dos lisados obtidos. Entretanto, pela Tabela VIII pode-se verificar que apenas 3 linhagens indicadoras, IL 929, IL 930 e IL 408, todas pertencentes ao Grupo G3, assim como 19% das culturas em estudo, demonstraram sensibilidade a um ou mais fagos liberados por, somente, 3 das culturas induzidas. Por outro lado, obtiveram-se 100% da indução, medida pelo clareamento do meio e pela curva de crescimento em biofotômetro, indicando que todas as 21 culturas eram lisogênicas. Esses resultados foram superiores aos encontrados por KOZAK *et alii* (1973) com *S. cremoris* e *S. lactis*, os quais, após indução das culturas com U.V., verificaram liberação de profagos em apenas 8% das 87 culturas testadas. Também HUGGINS e SANDINE (1977) e DAVIES e GASSON (1981), utilizando-se de método similar, relataram que 20% de um total de 69 linhagens e 60% de 63 linhagens, respectivamente, eram lisogênicas.

DAVIES e GASSON (1984) concluem que a maioria, senão todos os estreptococos lácticos são lisogênicos e que as variações nas freqüências de aparecimento encontradas refletem, provavelmente: os diferentes critérios usados para determinação

da lisogenia, a subjetividade na interpretação das quedas de densidade óptica encontradas nas curvas de crescimento após indução, e a dificuldade de se encontrar linhagens indicadoras.

A rara freqüência de linhagens indicadoras já havia sido discutida por LOWRIE e PEARCE (1971 b), LOWRIE (1974), HEAP *et alii* (1978) e TERZAGHI e SANDINE (1981), apesar de REYROLLE *et alii* (1982) terem encontrado que 25% das linhagens testadas serviram como indicadoras. O presente trabalho vem reafirmar a dificuldade de dispor-se de linhagens indicadoras, pelo fato de não ter sido possível detectar todos os fagos liberados por meio das linhagens usadas. Por outro lado, a existência de linhagens lisogênicas pertencentes somente ao grupo G3 pode refletir, apenas, como discutido por REYROLLE *et alii* (1982), o pequeno tamanho da amostra, além da não disponibilidade de uma linhagem indicadora específica para os grupos G4, G5 e G6.

Confirmou-se, também, uma especificidade na reação lítica entre o fago temperado e a bactéria, pois, todos os profagos originados de culturas do grupo G3 foram capazes de lisar somente linhagens deste mesmo grupo, de acordo com a classificação anteriormente feita em relação aos fagos virulentos. Dentre elas, a maioria trata-se de *S. lactis* (310, 163, 175 e 179), algumas não têm espécie identificada sendo, portanto, *Streptococcus* sp. (96, 97 e 105) e uma é *S. lactis* subsp. *diacetylactis* (162) (Tabela IX).

A liberação de fagos foi, para a maioria das linhagens sensíveis, muito intensa, situando-se entre  $10^4$  a  $10^6$  partículas por mililitro. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por REYROLLE *et alii* (1982) por meio de indução com mitomicina C.

As linhagens que já haviam sido classificadas com base na sua sensibilidade aos fagos virulentos são lisogênicas, sendo os fagos temperados liberados após indução com U.V. pertencentes ao mesmo grupo de sensibilidade. Esta correlação entre fagos temperados e virulentos já foi comprovada também a nível morfológico, por TEUBER e LEMBKE (1982). Ademais, confirma a hipótese de LAWRENCE *et alii* (1978) de que não se deve misturar, nos fermentos lácticos, linhagens sensíveis aos fagos das demais culturas componentes do mesmo.

Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos, na elaboração de fermentos múltiplos ou mistos, a partir das culturas aqui estudadas, não se poderia misturar as linhagens 96, 163, 310 ou 97 com a 175 e a linhagem 163 com a 179. Isto significa que as linhagens lisogênicas podem constituir-se em reservatório de fagos virulentos, capazes de lisar as linhagens sensíveis, ou sofrer mutação contra seu próprio hospedeiro, podendo ocasionar problemas graves durante os processamentos de queijo (McKAY e BALDWIN, 1973; LAWRENCE *et alii*, 1976; HUGGINS e SANDINE, 1977 e REYROLLE *et alii*, 1982).

Finalizando, a indução das linhagens lisogênicas



e o espectro lítico de seus profagos permitiram a classificação das culturas 96, 97 e 175 no grupo G3 (Tabela IX), coisa que não foi possível fazer por meio do teste com fagos virulentos, assim como confirmou a classificação anteriormente feita por aquele método, para as culturas 310, 163 e 179. Este fato corrobora a validade e aplicação da classificação proposta por CHOPIN *et alii* (1976) para culturas lácticas provenientes de diferentes origens.

TABELA IX. Agrupamento dos estreptococos lácticos pertencentes à coleção do ITAL, de acordo com a classificação proposta por CHOPIN *et alii* (1976) e REYROLLE *et alii* (1982).

Grupo de classificação	Nº Cultura
1	168
2	307 309 16 262
3	310 105 162 179 175 96 163 97

5.6. Estudos feitos com o *Streptococcus cremoris*, linhagem 839, pertencente à coleção do INRA

5.6.1. Evidência de um sistema de restrição/modificação

Foi COLLINS (1956) quem demonstrou pela primeira vez a existência de sistemas de restrição e modificação nos estreptococos lácticos. Por esses sistemas, quando o DNA do bacteriófago penetra na célula bacteriana, esta o destrói, por meio da ação de uma endonuclease capaz de cortar o DNA em sítios específicos, a menos que os mesmos tenham sido previamente modificados pela ação de uma metilase ou glicosidase e, assim, protegidos da ação das enzimas de restrição. Neste último caso, o fago realiza seu ciclo lítico normal (KRÜGER e BICKLE, 1983).

A evidência bioquímica da existência dessas enzimas nos estreptococos lácticos foi fornecida por FITZGERALD *et alii* (1982) quando do isolamento de uma endonuclease de restrição do tipo II, em *S. cremoris*.

A existência de sistemas de R/M nos estreptococos lácticos já está bem estabelecida sabendo-se, atualmente, que os mesmos estão amplamente distribuídos neste gênero de bactérias, podendo existir, mesmo, vários sistemas diferentes de R/M na mesma linhagem (BOUSSEMAER *et alii*, 1980; DALY e FITZGERALD, 1982; DAVIES e GASSON, 1981, 1983; MCKAY, 1983 e CHOPIN *et alii*, 1984).

Evidenciou-se, neste trabalho (Tabela X), que o *S. cremoris* linhagem IL 839, possuía um sistema de restrição de 5 log em relação ao fago 8, quando este era multiplicado sobre IL 835, sua linhagem original de propagação. Quando o fago era propagado sobre IL 839, esta modificava-o, não mais restringindo-o. Desde que propagado novamente sobre IL 835, o fago perdia a modificação adquirida quando de sua passagem por IL 839, a qual passava a restringi-lo novamente, também em 5 log como no estoque original, indicando que um sistema de R/M estava envolvido.

Estudou-se, a seguir, a base genética desse sistema de R/M encontrado em IL 839.

#### 5.6.2. Caracterização e determinação do peso molecular dos plasmídios de *S. cremoris* IL 839

O estudo da biologia de plasmídios tem se tornado importante área de investigação nas bactérias lácticas já que numerosas características fermentativas e metabólicas, incluindo a resistência a fagos, de grande instabilidade em alguns desses organismos, estão ligadas a genes localizados em plasmídios (KEMPLER e MCKAY, 1981; MCKAY, 1982, 1983; CROW *et alii*, 1983; DAVIES e GASSON, 1983; GASSON, 1984; DAVEY, 1984 e MCKAY e BALDWIN, 1984).

Assim, a fim de conhecer a constituição de plasmídios da linhagem IL 839, o mesmo foi determinado por meio de eletroforese do DNA obtido por extração alcalina (item 4.14.1.) e confirmado por eletroforese bidimensional (item 4.16.) (Figura 7).

TABELA X. Evidência da presença de um mecanismo de R/M em *S. cremoris* IL 839, ativo sobre o fago 8.

Linhagem hospedeira	Eficiência de multiplicação do <sup>a/</sup>		
	Fago 8 (IL 835) <sup>b/</sup>	Fago 8 (IL 835 - IL 839) <sup>c/</sup>	Fago 8 (IL 835 - IL 839 - IL 835) <sup>d/</sup>
IL 835	1	1	1
IL 839	$2,0 \times 10^{-5}$	1	$2,0 \times 10^{-5}$

a/ Eficiência de multiplicação =  $\frac{\text{n}^\circ \text{ de fagos multiplicados sobre a cultura estudada}}{\text{n}^\circ \text{ de fagos multiplicados sobre a cultura de propagação}}$

b/ O fago 8 foi propagado sobre a linhagem IL 835.

c/ O fago 8 foi propagado sucessivamente sobre as linhagens IL 835 e IL 839.

d/ O fago 8 foi propagado sucessivamente sobre as linhagens IL 835, IL 839 e IL 835.

Após sua extração, os plasmídios que normalmente estão sob a forma super-esprialada (CCC) são, algumas vezes, quebrados, podendo-se encontrá-los, então, sob a forma relaxada (OC) ou mesmo sob a forma linear (L). A eletroforese bidimensional permite recuperar as bandas correspondentes ao DNA plasmidial sob a forma CCC, as quais devem, inicialmente, ser levadas em conta na determinação do perfil de plasmídios da cultura.

A técnica de extração utilizada neste trabalho, entretanto, não altera o DNA; conseqüentemente, todas as formas observadas correspondem a plasmídios sob a forma CCC. Assim, a cultura IL 839 possui 8 plasmídios que foram denominados pIL 20 a pIL 27.

Os pesos moleculares dos oito plasmídios da linhagem IL 839 foram estimados por cálculo, utilizando-se a metodologia de MEYERS *et alii* (1976) (item 4.17.). Para tanto, foram incluídos no mesmo gel de eletroforese, juntamente com IL 839, os seguintes plasmídios de pesos moleculares conhecidos: pBR 322, pVA 749 $\Delta$  e pVA 856 (item 4.2.) e os plasmídios de *S. lactis* IL 1437 (CHOPIN *et alii*, 1984). A Figura 8 mostra os resultados obtidos.

Estimaram-se os tamanhos dos plasmídios pIL 20 a pIL 27 com sendo, respectivamente, de 3, 5, 6, 9, 14, 15, 17 e 46 Kb.

Eletroforese do extrato  
plasmidial de IL 839

Eletroforese bidimensional (a)

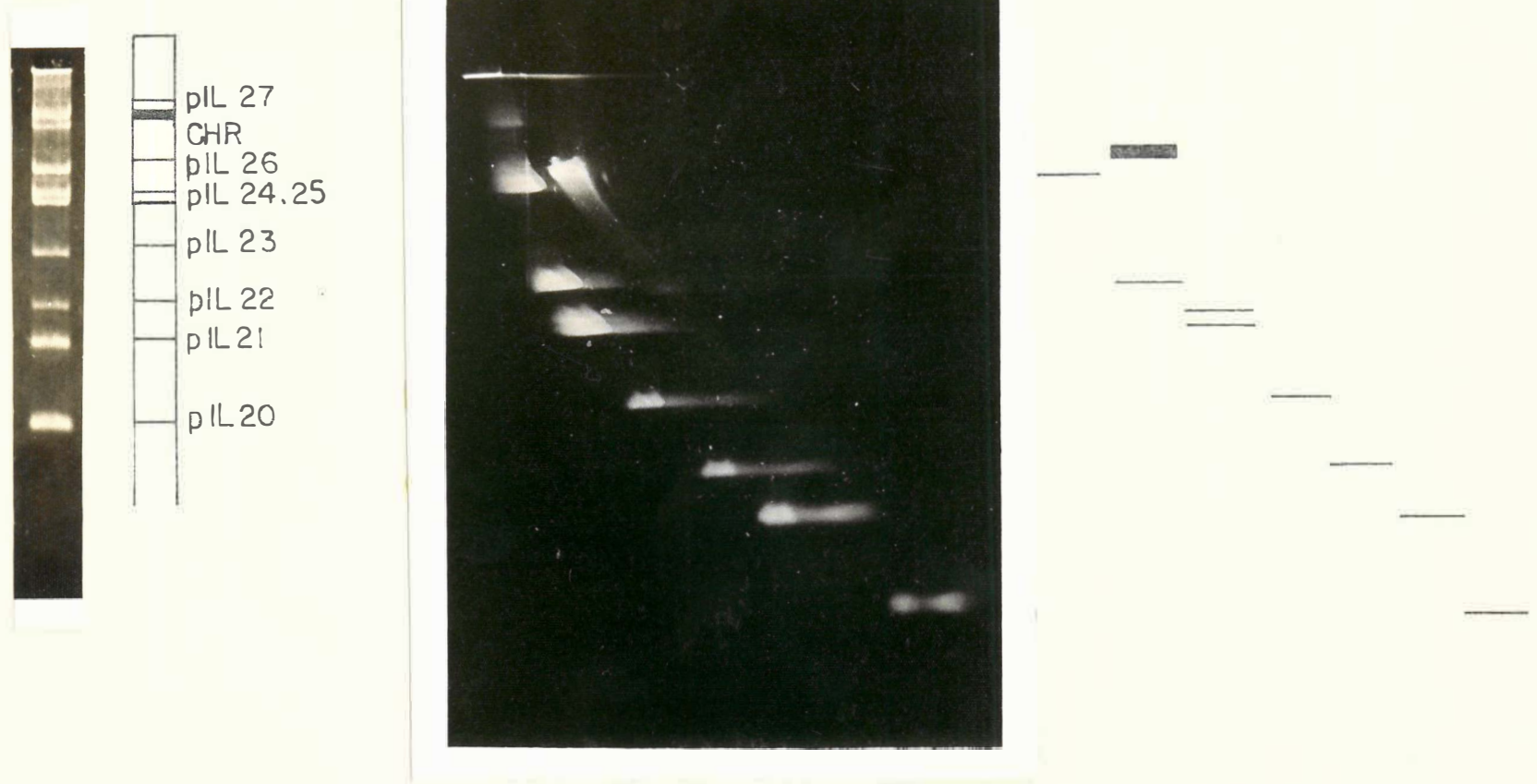


FIGURA 7. Perfil e eletroforese bidimensional dos plasmídios de *S. cremoris* IL 839. (a) Legenda: — DNA plasmidial sob a forma super-espiralada (CCC); — DNA cromossômico.

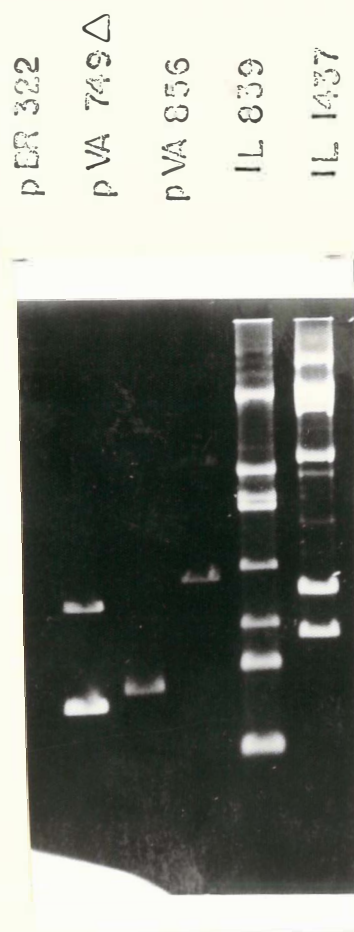


FIGURA 8. Eletroforese horizontal dos plasmídios pBR 322, pVA 749 $\Delta$ , pVA 856, de IL 839 e de IL 1437.

### 5.6.3. Localização dos genes que codificam o sistema de restrição/modificação presente em *S. cremoris* IL 839

#### 5.6.3.1. Plasmídios

##### (a) *Cura de plasmídios*

Pesquisou-se, inicialmente, se o sistema de R/M presente em IL 839 era codificado por um dos 8 plasmídios presentes nesta linhagem. Isto porque, de um lado, sabe-se que as principais propriedades tecnológicas dos estreptococos lácticos são codificadas por plasmídios, como já citado anteriormente e, por outro lado, há diversas evidências na literatura que associam as perdas de sistemas de R/M à frequências correspondentes à perda de plasmídios (LIMSOWTIN *et alii*, 1978; SANDERS e KLAENHAMMER, 1980, 1981, TEUBER e LEMBKE, 1983 e CHOPIN *et alii*, 1984). Já foi evidenciado, também, que alterações nas propriedades de adsorção dos estreptococos lácticos podem ser devidas, em alguns casos, à aquisição ou perda de plasmídios (SANDERS e KLAENHAMMER, 1983 e DE VOS *et alii*, 1984).

A fim de determinar se o sistema de R/M de IL 839 estava relacionado a um ou a vários dos seus plasmídios, os mesmos foram eliminados um a um, por meio da técnica de regeneração de protoplastos (GASSON, 1983). Foram obtidos 16 tipos de variantes, tendo todos perdido pelo menos um dos 8 plasmídios (Figuras 9 e 10) presentes na linhagem original. Não foi possível obter, entretanto, a cura do plasmídio pIL 21 em nenhum dos variantes.



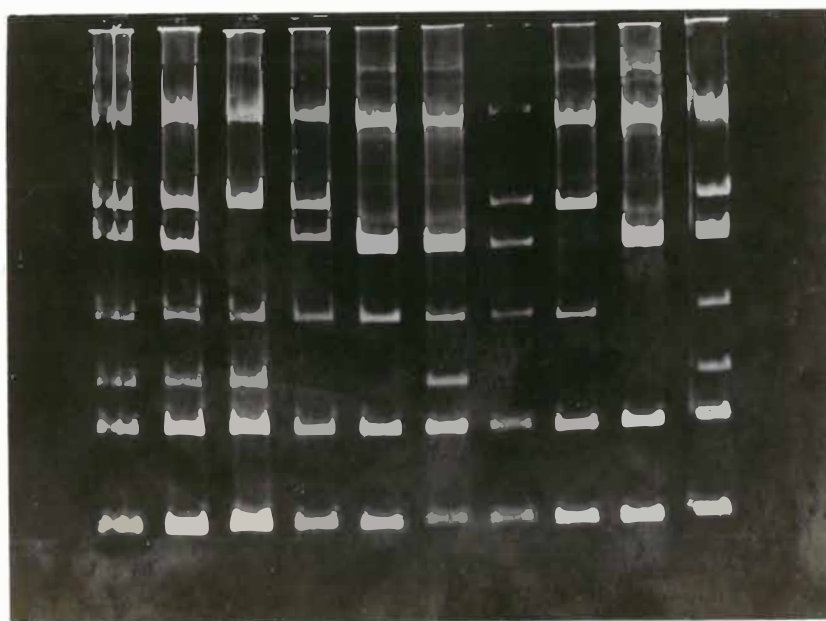


FIGURA 9. Perfis de plasmídios de variantes de *S. cremoris* IL 839 obtidos pela cura de plasmídios.

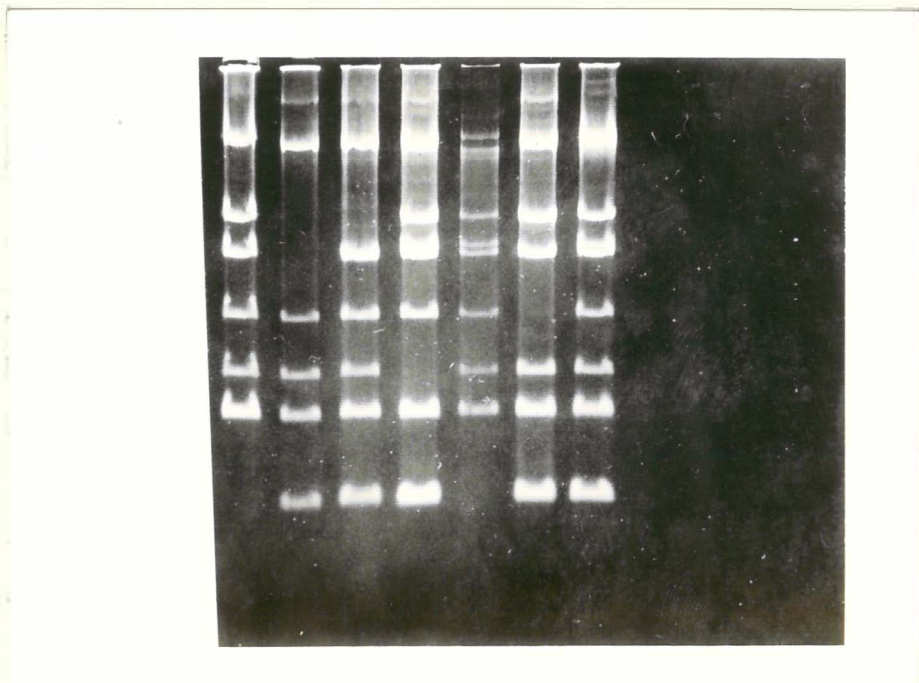


FIGURA 10. Perfis de plasmídios de variantes de *S. cremoris* IL 839 obtidos pela cura de plasmídios

A técnica de regeneração de protoplastos já utilizada por CHOPIN *et alii* (1984) e GASSON (1984) resultou em excelente método de cura de plasmídios pois, por meio dela, pode-se estabelecer o papel de 7 dos 8 plasmídios presentes em IL 839 em relação à base genética do sistema de R/M. Todos os variantes obtidos apresentavam resistência idêntica à linhagem original. Isto indica que nenhum dos 7 plasmídios eliminados codificava o sistema de R/M em IL 839.

(b) *Preparação do plasmídio pIL 21 por recuperação a partir de um gel de agarose*

A fim de estabelecer se o plasmídio pIL 21 tinha alguma função no mecanismo de R/M linhagem IL 839, foi introduzido em *Streptococcus lactis* linhagem IL 1403 livre de plasmídios (CHOPIN *et alii*, 1984). Dessa forma, efetuou-se, inicialmente, uma preparação do plasmídio pIL 21, a qual foi transferida, posteriormente, para a linhagem IL 1403, pela técnica de cotransformação juntamente com um plasmídio indicador, pHV 1301, contendo marca de resistência à eritromicina (item 4.2.).

O conteúdo plasmidial da linhagem IL 839 foi extraído em grande quantidade (item 4.14.2.) e submetido a uma eletroforese preparativa em gel de agarose vertical (item 4.15.). As Figuras 11 e 12 apresentam os plasmídios antes e após recuperação da banda referente ao plasmídio pIL 21.

Pela Figura 11 pode-se observar que os diferentes plasmídios estão presentes no gel, tanto sob as formas CCC como OC.

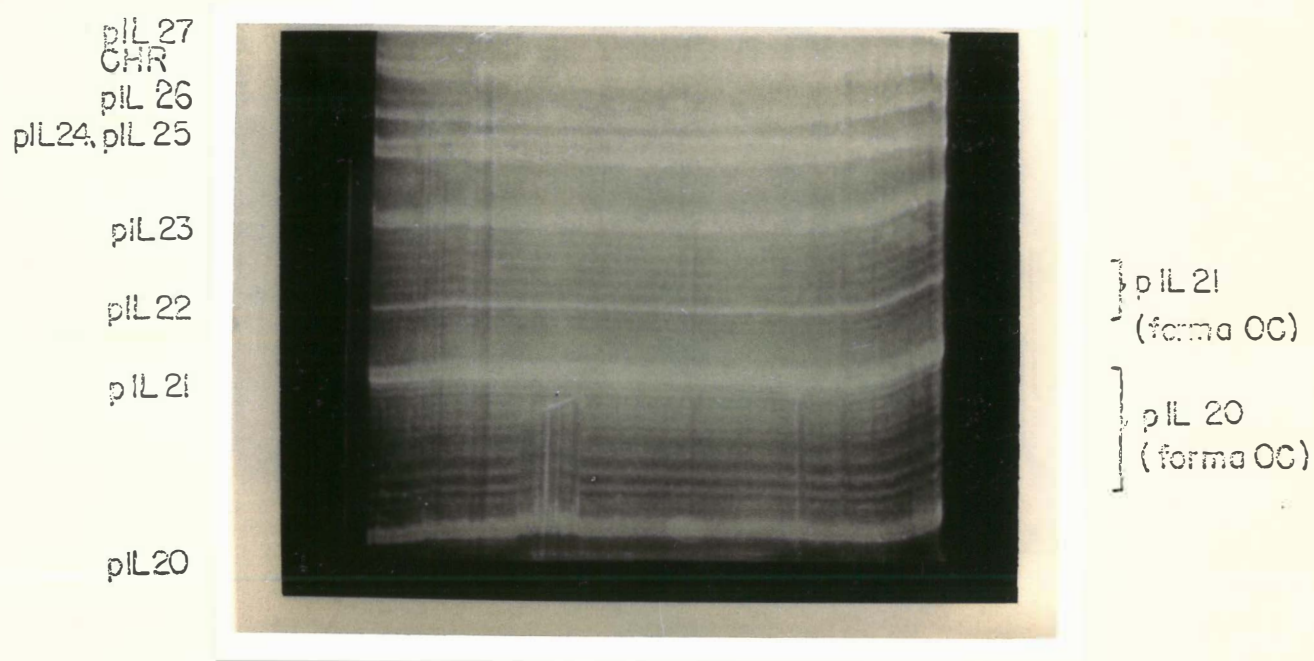


FIGURA 11. Eletroforese vertical de uma extração preparativa dos plasmídios de IL 839.

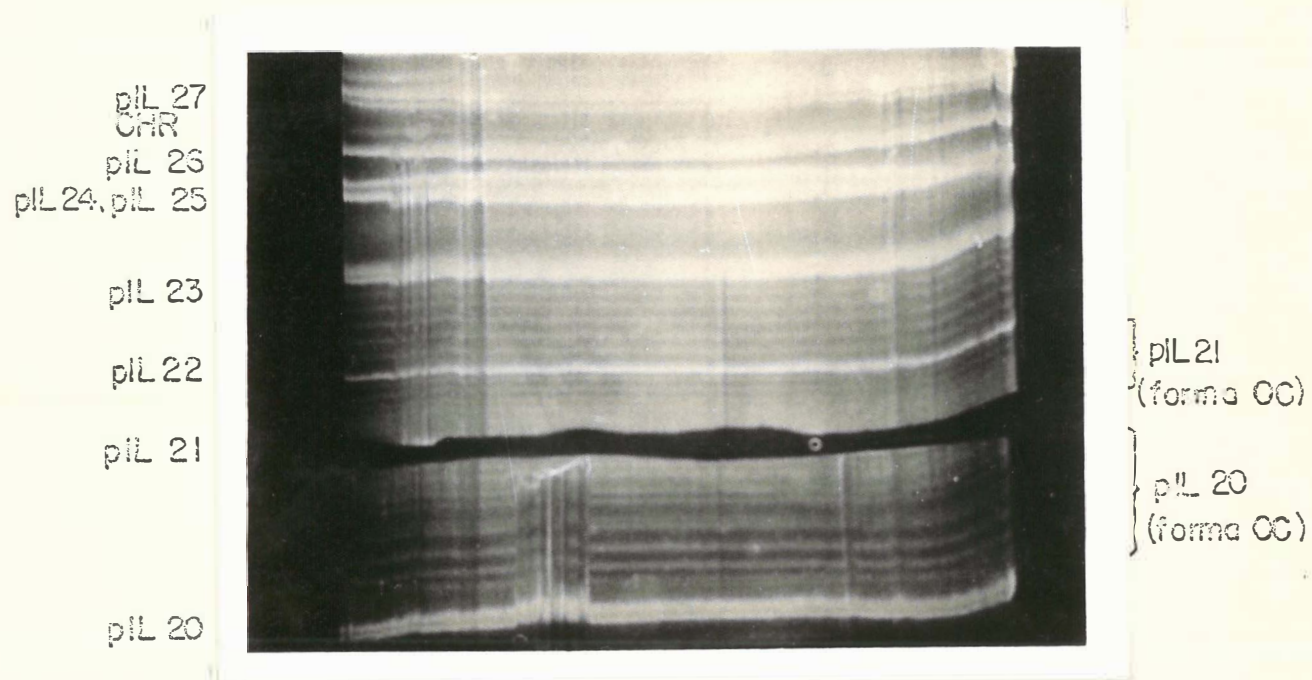


FIGURA 12. Eletroforese vertical de uma extração preparativa dos plasmídios de IL 839, após recorte da banda relativa ao plasmídio pIL 21.

O pIL 21 foi recuperado a partir da banda recortada do gel de agarose (Figura 12), a qual foi submetida a um processo de eletro-eluição (item 4.19). Essa mistura de DNAs, contendo as formas CCC do pIL 21 e as formas OC de pIL 20 e pIL 21, foi utilizada para o experimento de transformação (item 4.26.).

(c) *Transferência do plasmídio pIL 21 por co-transformação*

Muitos plasmídios encontrados em bactérias lácticas, como o pIL 21 de *S. cremoris* IL 839, permanecem crípticos pela impossibilidade de introduzi-los em linhagens adequadas para investigações genéticas. Este problema tem sido resolvido em outras espécies de microrganismos por meio da aplicação do método de cotransformação de uma linhagem bacteriana competente, utilizando-se dois plasmídios diferentes, sendo um deles selecionável (KRETSCHMER *et alii*, 1975 e MACRINA *et alii*, 1980). Uma técnica similar, adaptada aos *S. lactis* por SIMON *et alii* (1985) permitiu que se estudasse a função do plasmídio pIL 21 na base genética do sistema de R/M de IL 839.

A transformação de *S. lactis* IL 1403 foi feita com 0,2µg/ml de pHV 1301 e 0,08µg/ml de pIL 21, ou seja, a mistura de DNA obtida como descrito anteriormente. Foram obtidos  $2,7 \times 10^5$  transformantes resistentes à eritromicina por micrograma de pHV 1301. Após uma seleção feita do conteúdo plasmidial de 100 transformantes resistentes à eritromicina ( $Em^r$ ),

que possuíam o pHV 1301, obtiveram-se: 73 transformantes que continham apenas o pHV 1301; 2 transformantes que continham o pHV 1301 e pIL 21; 1 continha o pHV 1301, pIL 21 e pIL 20, e 24 transformantes que possuíam pHV 1301 e pIL 20. Estes dois últimos resultados obtidos devem-se ao fato de que o plasmídeo pIL 20, mesmo sob a forma OC, transformou com alta eficiência a linhagem IL 1403.

O plasmídeo indicador pHV 1301 segrega espontaneamente. Dessa forma, após algumas repicagens sucessivas, isolaram-se cotransformantes que haviam perdido o pHV 1301 e conservado, unicamente, o plasmídeo pIL 21 (Figura 13).

Os cotransformantes que possuíam apenas o plasmídeo pIL 21 foram testados contra os fagos 66 e 67 (virulentos contra a cultura transformante), observando-se que não haviam adquirido o sistema de restrição/modificação, mostrando-se, portanto, sensíveis aos bacteriófagos.

Estes resultados indicaram, portanto, que o plasmídeo pIL 21, assim como os outros testados, também não codificava o sistema de R/M presente em *S. cremoris* IL 839, não sendo este último, dessa forma, de natureza plasmidial, mas sim, determinado por genes localizados no cromossomo. Estes fatos evidenciam, pela primeira vez, um sistema de R/M sendo codificado por genes cromossômicos em bactérias lácticas.

#### 5.6.3.2. Cromossomo

A fim de isolar os genes cromossomais que codificam o sistema de R/M em *S. cremoris* IL 839 era necessário

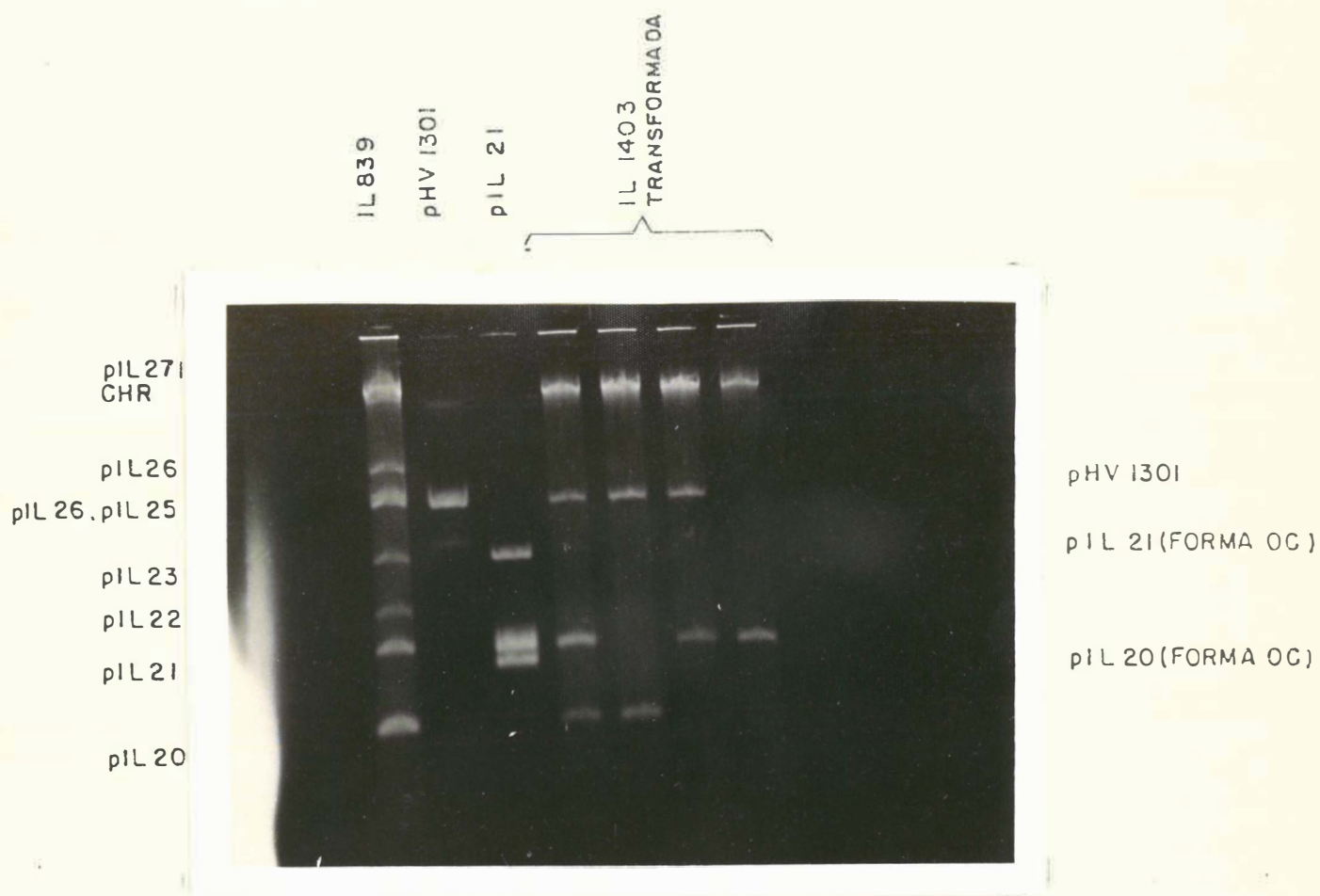


FIGURA 13. Transferência de um plasmídeo críptico de *S. cremoris* IL 839 para *S. lactis* IL 1403, por cotransformação.



utilizar-se técnicas de engenharia genética. Para tanto, deveria dispor-se de: (1) um método que permitisse cortar e religar os DNAs de origens diferentes; (2) vetores de clonagem, ou sejam, fragmentos de DNA capazes de replicarem-se na célula hospedeira após terem sofrido a inserção de um outro DNA estranho a ele; (3) um método que possibilite a penetração do DNA híbrido na célula hospedeira dentro da qual possa replicar-se como a transformação e (4) uma técnica de detecção das células que continham e que replicaram aquele DNA recombinante em estudo, contendo os genes procurados.

No caso das bactérias lácticas pode-se, a priori, pensar em utilizar os plasmídios vetores já desenvolvidos para outras bactérias Gram +, como estreptococos, estafilococos e *Bacillus* (CLEWELL *et alii*, 1974, MACRINA *et alii*, 1980, BEHNKE *et alii*, 1982 e KOK *et alii*, 1984), alguns já utilizados com sucesso na clonagem de genes plasmidiais (KONDO e MCKAY, 1984 e CHOPIN *et alii* (Appl. Environ. Microbiol.), em publicação) ou em construí-los novamente inserindo genes de resistência a antibióticos em pequenos plasmídios de bactérias lácticas.

O problema maior, até pouco tempo, situava-se ao nível de introdução do DNA recombinante na bactéria por transformação. Os primeiros rendimentos de transformação de protoplastos de *S. lactis* obtidos por KONDO e MCKAY (1982, 1983), a partir da técnica descrita por CHANG e COHEN (1979) foram da ordem de 10 transformantes por micrograma de DNA. Eles eram muito

baixos para permitir a clonagem mesmo de genes plasmidiais. Os mesmos autores (1984), assim como SIMON *et alii* (1985) conseguiram aumentá-las para  $10^4$  transformantes por micrograma de DNA. Estes últimos rendimentos permitiam a clonagem de genes plasmidiais sendo, entretanto, ainda insuficientes para objetivar a clonagem de genes cromossômicos.

Posteriormente, entretanto, o laboratório de CHOPIN (informação pessoal) obteve resultados de transformação com frequências da ordem de  $10^6$  a  $10^7$  transformantes por micrograma de DNA. Estes rendimentos permitiam a clonagem de genes cromossômicos (ou clonagem "shotgun"), a partir do DNA celular total.

(a) *Extração preparativa do DNA cromossômico de S. cremoris IL 839*

Para clonar os genes responsáveis pelo sistema de R/M presente em *S. cremoris* IL 839 havia necessidade primeiramente, de se extrair em grande quantidade o DNA cromossômico daquela linhagem. Assim, o DNA cromossômico da linhagem IL 839 foi extraído de acordo com a metodologia descrita no item 4.22. Efetuou-se, posteriormente, uma eletroforese horizontal desse DNA extraído, juntamente com o DNA do fago  $\lambda$ , a fim de quantificá-lo. Obteve-se, dessa forma, um extrato cromossômico contendo  $400\mu\text{g}/\text{ml}$  de DNA.

(b) *Digestão parcial do cromossomo de IL 839 por Hpa II*

Para obter fragmentos menores de DNA passíveis de serem clonados, realizou-se uma digestão parcial do cromossomo. Escolheu-se a digestão parcial aumentando-se o tamanho dos fragmentos a serem clonados e aumentando-se, conseqüentemente, a probabilidade de clonar o fragmento procurado. Ademais, havia a possibilidade de que os genes codificando o sistema de R/M do IL 839 possuissem um tamanho superior a 4 Kb, ou seja, o tamanho médio que se obtém quando de uma digestão total do DNA (MALCOM, 1981 e MANIATIS *et alii*, 1982).

Para digerir o DNA cromossômico de IL 839 utilizou-se a enzima de restrição Hpa II por ser a única que permite efetuar-se uma digestão parcial, por meio do reconhecimento de uma seqüência de 4 nucleotídios (MANIATIS *et alii*, 1982). Por outro lado, o vetor escolhido, pVA 749 $\Delta$  possuía um sítio de corte para esta enzima.

Determinou-se, primeiramente, qual a diluição conveniente de enzima a ser utilizada para obter uma digestão parcial do cromossomo (Figura 14). Através de eletroforese vertical em gel de agarose, tendo como testemunha o DNA do fago  $\lambda$  digerido pela enzima Hind III, pode-se determinar que com 0,5 UI de Hpa II por microlitro obtinha-se a digestão parcial desejada do cromossomo de IL 839. Objetivou-se, nesse caso, uma digestão tal onde se obtivesse essencialmente fragmentos possuindo entre 10 a 20 Kb. Efetuou-se, a seguir, a digestão, porém de uma quantidade maior de cromossomo, ou seja, 250 $\mu$ g, utilizando-se 0,5 UI de Hpa por microlitro.

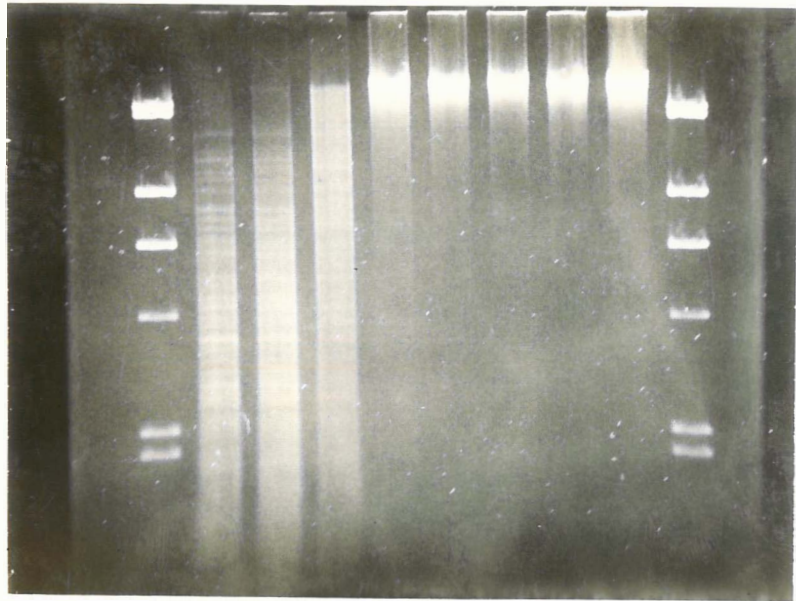


FIGURA 14. Digestão parcial do cromossomo de IL 839 por Hpa II.

(c) Seleção por tamanho dos fragmentos cromossomais de IL 839

Em experimentos preliminares, imediatamente após a digestão parcial do cromossomo realizava-se a ligação com o plasmídeo vetor, sem resultados positivos após transformação. Assim, decidiu-se fazer uma seleção por tamanho, em gradiente de sacarose, dos fragmentos de DNA cromossômico obtidos (item 4.24.). Foram coletadas alíquotas de aproximadamente 100  $\mu$ l e 5  $\mu$ l, de cada 3 frações, foram submetidas a eletroforese vertical, a fim de selecionar os fragmentos de tamanho desejado (10 a 20 Kb), os quais foram utilizados na fabricação do DNA recombinante. A Figura 15 mostra alguns dos resultados obtidos.

Como não se conhecia exatamente o tamanho dos genes que codificam o sistema de R/M, os quais se desejava clonar, seguiu-se orientação baseada no trabalho de GINGERAS e BROOKS (1983). Estes autores clonaram um fragmento de plasmídeo de *Pseudomonas aeruginosa* de 7,6 Kb codificando para uma determinada atividade de R/M. Após terem diminuído o tamanho do mesmo para, aproximadamente, 5 Kb, obtiveram tanto os genes que codificavam o sistema de restrição, como aqueles de modificação.

A técnica utilizada no presente trabalho apresentou o inconveniente de selecionar fragmentos com tamanhos dispersos, de 5 Kb a mais de 20 Kb. Assim, a seleção por tamanho dos fragmentos cromossômicos está sendo feita, atualmente, no

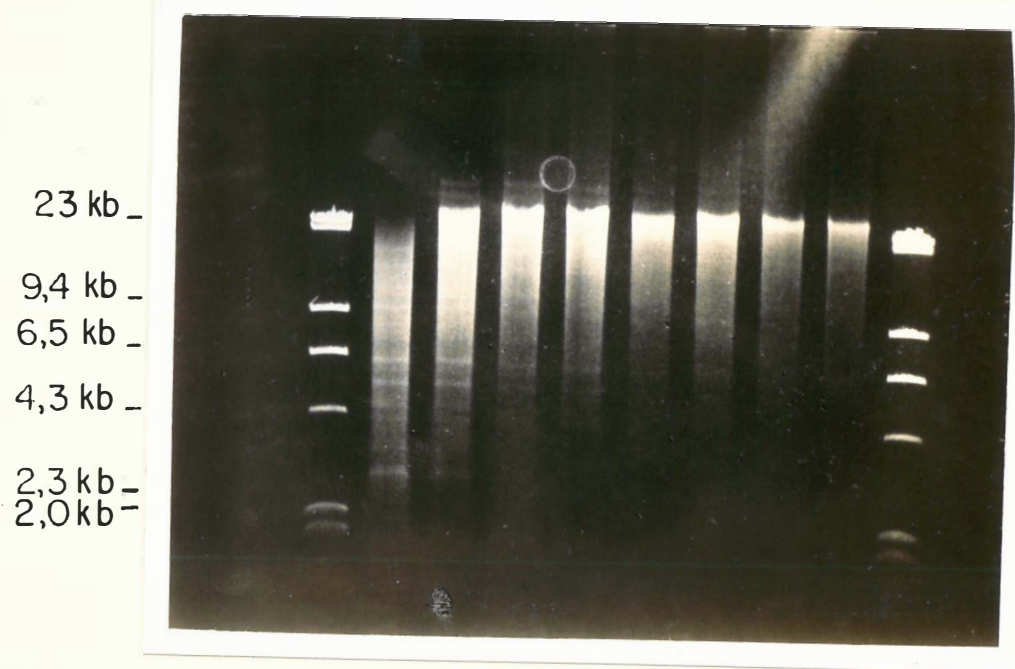


FIGURA 15. Eletroforese vertical dos fragmentos obtidos por digestão parcial do cromossomo IL 839 após passagem por gradiente de sacarose.

laboratório do INRA, por meio de eletroforese preparativa, a qual permite, cortando-se o gel, eliminar todos os fragmentos de tamanho superior ou inferior a um determinado limite.

*(d) Fabricação do DNA recombinante*

O DNA recombinante utilizado para transformar IL 1403 foi fabricado a partir dos fragmentos de cromossomo obtidos como descrito no item anterior, e o plasmídeo vetor pVA 749Δ igualmente cortado com a enzima Hpa II (item 4.21.). O DNA recombinante obtido após ligação (item 4.25.) pode ser observado na Figura 16.

O DNA recombinante assim produzido foi utilizado para a transformação de *S. lactis* IL 1403.

*(e) Transformação*

Efetuuou-se a transformação de *S. lactis* IL 1403 com o DNA recombinante fabricado como citado no item 4.25., seguindo-se metodologia descrita por SIMON *et alii* (1985).

Após incubação durante 7 dias, para regeneração dos protoplastos, 100 colônias crescidas em placas contendo M17 + Gli + 5µg de eritromicina por mililitro foram repicadas para tubos contendo o mesmo meio, na forma líquida.

A partir daí efetuaram-se dois testes: (1) plaqueamento das colônias em presença dos fagos 66 e 67, para verificação da possível aquisição dos genes responsáveis pelo

(a) (b) (c)

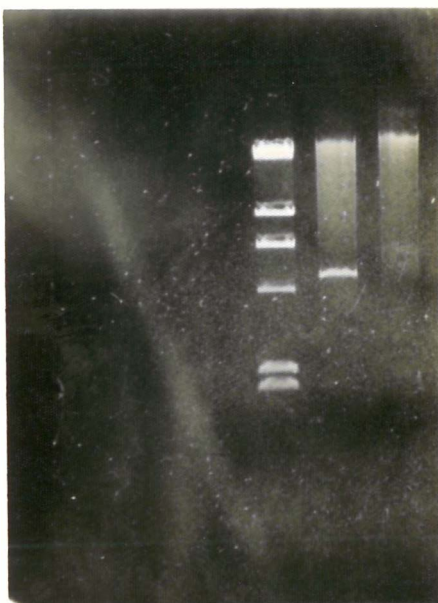


FIGURA 16. DNA recombinante formado pelo cromossomo de *S. cerevisiae* IL 839 e pelo plasmídeo pVA 749 $\Delta$ . (a) DNA do fago  $\lambda$  digerido por Hind III; (b) cromossomo IL 839 e pVA 749 $\Delta$  digeridos por Hpa II, antes de ligação; (c) cromossomo IL 839 e pVA 749 $\Delta$  digeridos por Hpa II, após ligação.



sistema de R/M e (2) extração dos plasmídios de todos os clones para verificar se havia uma banda correspondente ao fragmento cromossômico inserido no DNA recombinante.

Observou-se que nenhum dos 100 clones havia adquirido resistência aos fagos ensaiados, significando que o fragmento cromossômico contendo o gene que codifica o sistema de R/M em *S. cremoris* IL 839 não havia sido transformado. Ademais, um exame do conteúdo plasmidial dos transformantes evidenciou que menos de 1% dos clones havia adquirido o plasmídio pVA 749Δ, sendo que nenhum deles apresentava uma inserção.

Experimentos realizados por outros membros do laboratório da Dra. M. -C. CHOPIN, em Rennes, França, mostraram que a ausência de uma inserção não resultava de um defeito na fabricação do DNA recombinante, mas, que ela é devida à natureza do vetor utilizado. Outros vetores como pHV 1301 ou pGK 12, manipulados nas mesmas condições permitiram obter-se, aproximadamente, 10% de clones que possuíam o DNA recombinante, sendo esta a frequência normal.

Concluiu-se, assim, que o vetor pVA 749Δ não convém a este tipo de experimento, por não poder se manter na linhagem IL 1403 quando possui um fragmento de DNA a ele inserido. Até o momento nenhuma hipótese válida pode ser elaborada para explicar o fato de que pVA 749Δ funcione bem em *S. sanguis* (Challis) e não em *S. lactis*.

O grupo da Dra. CHOPIN, portanto, construiu um vetor, a partir do plasmídeo pHA 1301 (13 Kb), possuindo um tamanho reduzido para 5,5 Kb. Este vetor obtido transforma *S. lactis* com rendimentos de  $3,0 \times 10^7$  transformantes por micrograma de DNA. A este pequeno vetor foi inserido um "poly linker", ou seja, um fragmento de DNA contendo 82 pares de bases que contêm 12 sítios de restrição, aproximadamente, facilitando, enormemente, a técnica de clonagem.

## 6. CONCLUSÕES

Os principais objetivos do presente trabalho foram: (1) caracterização de culturas pertencentes à Coleção de Fermentos Lácticos do ITAL quanto a crescimento em diferentes temperaturas, liberação espontânea ou induzida de bacteriófagos e perfil de plasmídeos e (2) estudo da base genética de um sistema de restrição e modificação em *S. cremoris* IL 839 com o propósito de cloná-lo.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se tirar as seguintes conclusões:

(a) Somente 17 dentre 124 culturas lácticas do ITAL não conseguiram crescer a 23°C durante 18 horas, demonstrando não serem boas acidificantes;

(b) As culturas lácticas do ITAL mostraram maior atividade acidificante após incubação a 30°C durante 90 min e 38°C durante mais 4 horas, evidenciando serem, na sua maioria, do tipo rápidas ("fast");

(c) Apenas duas culturas, 166 e 280, liberaram espontaneamente bacteriófagos, não devendo, portanto, serem utilizadas em processamento;

(d) De 58 culturas lácticas do ITAL, estudadas quanto à biologia de plasmídios, 21 apresentaram perfis diferentes, com número variado de plasmídios e as restantes apresentaram um dos 6 tipos de perfis análogos;

(e) Todas as 21 culturas apresentando perfis de plasmídios diferentes são lisogênicas, liberando profagos após indução com luz ultravioleta. Pôde-se determinar por este método que não se deve misturar, em fermento misto, as culturas 96, 163, 310 ou 97 com a 175 e a linhagem 163 com a 179;

(f) De acordo com a sensibilidade a fagos virulentos e profagos liberados após indução, as culturas lácticas brasileiras estudadas puderam ser classificadas da seguinte forma: grupo  $G_1 = 168$ ; grupo  $G_2 = 307, 309, 16$  e  $262$  e grupo  $G_3 = 310, 105, 162, 179, 163, 96, 97$  e  $175$ ;

(g) As culturas 310 e 162 apresentaram um sistema de restrição de 4 log e 2 log, respectivamente, em relação aos fagos virulentos 66, 67 e 188 para a primeira e 66

para a segunda. A resistência apresentada pelas linhagens 105 e 162 em relação ao fago 188 corresponderam a mutações sofridas por este último;

(h) O *S. cremoris* IL 839 apresenta um sistema de restrição/modificação de 5 log em relação ao fago 8. Nenhum dos 8 plasmídios presentes nesta linhagem codifica este sistema de resistência, sendo o mesmo codificado por genes situados no cromossomo;

(i) Na tentativa de clonar os genes cromossomais de R/M de IL 839 (clonagem "shotgun") utilizando-se do vetor pVA 749 $\Delta$ , apesar da transformação do DNA recombinante ter ocorrido, não foi possível isolarem-se clones transformantes pelo fato do vetor não se expressar em *S. lactis* IL 1403, linhagem transformada, quando ligado a um outro fragmento de DNA.

## 7. SUMMARY

This work was done with two main purposes: (1) to obtain a better characterization of lactic streptococci belonging to the Food Technology Institute (ITAL-Brazil) Collection of Lactic Starters, and (2) to study the genetic determination of a phage resistance system found in *S. cremoris* strain IL 839, belonging to a Collection of Lactic Cultures of the National Institute of Agronomic Research (INRA-France), with the objective of cloning it.

It was found that among 124 lactic bacterial cultures belonging to ITAL collection, only 17 failed to grow during 18 hours at 23°C, being this the first selection performed with mesophylic lactic cultures. These cultures resisted well to cooking temperature without alteration of their

acidifying activities and only two strains, 166 and 280, spontaneously released their bacteriophages and were therefore not recommended as lactic starters.

Among the lactic cultures from this collection, 2 out of 58 showed profiles of plasmids while in the remaining 37, 6 types of analogue profiles were observed. All cultures that showed different profiles were found to be lysogenic, releasing prophages after exposure to ultraviolet light. The lytic spectrum showed that based on virulent phages and on prophages released, one can classify the cultures in three groups:  $G_1$  = strain 168;  $G_2$  = strains 307, 309, 16 and 262 and  $G_3$  = strains 310, 96, 97, 105, 163, 175, 179 and 162. It was also observed that the cultures 310 and 162 showed restriction and modification systems of 4 log and 2 log, in relation to phages 60, 67 and 188 in the first case, and 66 for the second, respectively.

The *S. cremoris* IL 839 showed a restriction and modification system of 5 log in relation to phage 8. It was found that this strain had 8 plasmids termed pIL 20 to pIL 27, with sizes of 3, 5, 6, 9, 14, 15, 17 and 46 Kb. The protoplastization method enabled the curing of plasmids and showed that none were related to the R/M system. The plasmid pIL 21, not cured was cotransformed with the plasmid pHV 1301, used as a marker for erythromycin resistance, in *S. lactis* IL 1403, not provided with plasmids. It was found that the cotransformed

culture also failed to acquired the R/M system. It was concluded that the system was codified by genes present on the chromosome.

A partial digestion of the chromosome was performed with the restriction enzyme Hpa II, selection of fragments by size in a sucrose gradient followed by ligation to the vector plasmid pVA 749 $\Delta$  which harbours a resistant mark for erythromycine, and was linearized by the same enzyme. Cells of *S. lactis* IL 1403 transformed by this recombinant DNA had only the vector plasmid probably because the fragment insertion prevents it of surviving in this line.



## 8. LITERATURA CITADA

- ABD-EL-MALEK, Y. e T. GIBSON, 1948. Studies in the bacteriology of milk. I. The streptococci of milk. *Journal of Dairy Research*, 15: 233-248.
- ACCOLAS, J.-P., D. HEMME, M.J. DESMAZEAUD, L. VASSAL, C. BOUILLANNE e M. VEAUX, 1980. Les levains lactiques thermophiles: propriétés et comportement en technologie laitière. Une revue. *Le Lait*, 60: 487-524.
- ACKERMAN, H.-W., 1969. Bactériophages: propriétés et premières étapes, d'une classification. Revue générale. *Pathologie-Biologie*, 17: 1003-1024.
- ADAMS, N.H., 1950. *Bacteriophages*. New York, Interscience Publishers, Inc., p. 454-456.

- ALLEN, L.K., W.E. SANDINE e P.R. ELLIKER, 1963. Transduction in *Streptococcus lactis*. *Journal of Dairy Research*, 30: 351-357.
- ANDERSON, D.G. e L.L. MCKAY, 1977. Plasmids, loss of lactose metabolism, and appearance of partial and full lactose-fermenting revertants in *Streptococcus cremoris* B<sub>1</sub>. *Journal of Bacteriology*, 129: 367-377.
- ANDERSON, D.G. e L.L. MCKAY, 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 549-552.
- ANDERSON, D.G. e L.L. MCKAY, 1984. In vivo cloning of *lac* genes in *Streptococcus lactis* ML3. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 245-249.
- ANDERSON, D.G., D.H. OHLENDORF, Y. TAKEDA e B.W. MATTHEWS, 1981. Structure of the *cro* repressor from bacteriophage  $\lambda$  and its interaction with DNA. *Nature*, 290: 754-758.
- ANTUNES, L.A.F., 1985. Caracterização da flora láctica de leite cru. Campinas, UNICAMP, 113 p. (Tese de Doutorado).
- ARBER, W., 1974. DNA modification and restriction. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 14: 1-37.
- AUCLAIR, J. e J.-P. ACCOLAS, 1983. Use of thermophilic lactic starters in the dairy industries. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49: 313-326.

- AUSAVANODOM, N., R.S. WHITE, G. YOUNG e G.H. RICHARDSON, 1977. Lactic bulk culture system utilizing whey-based bacteriophage inhibitory medium and pH control. II. Reduction of phosphate requirements under pH control. *Journal of Dairy Science*, 60: 1245-1251.
- BABEL, F.J., 1955. Slow acid production by lactic cultures: A review. *Journal of Dairy Science*, 38: 705-733.
- BABEL, F.J., 1958. New developments in the lactic cultures: culture media and bacteriophage inhibition. *Journal of Dairy Science*, 41: 697-698.
- BABEL, F.J., 1962. Industrial utilization of lactic cultures. *Journal of Dairy Science*, 45: 1286-1290.
- BAUER, H., E. DENTAN e T. SOZZI, 1970. The morphology of some *Streptococcus* bacteriophages. *Journal of Microscopy*, 9: 891-898.
- BARKSDALE, L. e S.B. ARDEN, 1974. Persisting bacteriophages in infections, lysogeny, and phage conversion. *Annual Review of Microbiology*, 28: 265-299.
- BEHNKE, D., M.S. GILMORE e J.J. FERRETTI, 1982. pGB 301 vector plasmid family and its use for molecular cloning in streptococci. In: SCHLESINGER, D., Ed. *Microbiology*. Washington, D.C., ASM, p. 239-242.

- BELOVA, G.A., Z.P. MEDVEDEVA, A.N. KORNELYUK e T.F. TROFIMOVA, 1982. Study of some properties of lactic streptococci used in cheesemaking. *Dairy Science Abstracts*, 44: 455.
- BICKLE, T.A., 1982. The ATP-dependent restriction endonucleases. In: LINN, S.M. e R.J. ROBERTS, Eds. *Nucleases*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, Cold Spring Harbor, p. 85-108.
- BOLIVAR, F., R.L. RODRIGUEZ, P.J. GREENE, M.C. BETLACH, H.L., HEYNEKER, H.W., BOYER, J.H. CROSA e S. FALKOW, 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2: 95-113.
- BOTTAZZI, V., 1979. *Microbiologia dei fermenti lattici*. Futurgraf, Reggio Emilia, 324 p.
- BOUSSEMAER, J.P., P.P. SCHRAUWEN, J.L. SOURROVILLE e P. GUY, 1980. Multiple modification/restriction systems in lactic streptococci and their significance in defining a phage-typing system. *Journal of Dairy Research*, 47: 401-409.
- BOYD, J.M. e H.L.A. TARR, 1955. Inhibition of mold and yeast development in food products. *Food Technology*, 9: 411-412.
- BOYER, H.W., 1971. DNA restriction and modification mechanisms in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 25: 153-176.
- BRADLEY, D.E., 1963. The structure of coliphages. *Journal of General Microbiology*, 31: 435.

- BRADLEY, D.E., 1965. The morphology and physiology of bacteriophages as revealed by the electron microscope. *Journal of the Royal Microbiology Society*, 84: 257-316.
- BRADLEY, D.E., 1967. A review: ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 31: 230.
- BRADLEY, S.G. e L.A. JONES, 1968. Bacteriophages, their biology and industrial significance. *Progress in Industrial Microbiology*, 7: 43-75.
- BRIGGS, C.A.E., 1952. A note on the serological classification of *Streptococcus diacetylactis*. *Journal of Dairy Research*, 19: 167-168.
- BRIGGS, C.A.E. e L.G.M. NEWLAND, 1952. The serological classification of *Streptococcus cremoris*. *Journal of Dairy Research*, 19: 160-167.
- BRIGGS, C.A.E. e L.G.M. NEWLAND, 1953. Observations on the serological typing of groups N ('lactic') streptococci. *Journal of Dairy Research*, 20: 189-197.
- BUCHANAN, R.E. e N.E. GIBBONS, Eds., 1975. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, Waverly Press, Inc. 8<sup>th</sup> ed., 967 p.
- CALAM, C.T., 1964. The selection, improvement and preservation of microorganisms. *Progress in Industrial Microbiology*, 5: 1-53.

- CHANG, S. e S.N. COHEN, 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Molecular and General Genetics*, 168: 111-115.
- CHEN, Y.L. e G.H. RICHARDSON, 1977. Lactic bulck culture system utilizing whey-based bacteriophage inhibitory medium and pH control. III. Aplicability to cottage cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*, 60: 1252-1255.
- CHERRY, W.B. e D.W. WATSON, 1949 a. The *Streptococcus lactis* host - virus system. i. Factors inclucing quantitative mesurement of the virus. *Journal of Bacteriology*, 58: 601-610.
- CHERRY, W.B. e D.W. WATSON, 1949 b. The *Streptococcus lactis* host - virus system. II. Characteristics of virus growth and the effect of electrolytes on virus adsorption. *Journal of Bacteriology*, 58: 611-620.
- CHOPIN, A.P. e P. LANGELLA, 1982. Analogies de profils plasmi-ques chez les streptocoques du groupe N. *Le Lait*, 62: 705-719.
- CHOPIN, A.P., M.-C. CHOPIN, A. MOILLO-BATT e P. LANGELLA, 1984. Two plasmid - determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid*, 11: 260-263.

- CHOPIN, M.-C., 1980. Resistance of 17 mesophilic lactic *Streptococcus* bacteriophages to pasteurization and spray-drying. *Journal of Dairy Research*, 47: 131-139.
- CHOPIN, M.-C., A. CHOPIN e C. ROUX, 1976. Definition of bacteriophage groups according to their lytic action and mesophilic lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 32: 741-746.
- CHOPIN, M.-C. e M. ROSSEAU, 1983. Tubular heads in bacteriophages from lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 294-296.
- CHOPIN, M.-C., A. ROUAULT e M. ROUSSEAU, 1983. Elimination d'un prophage dans des souches mono- et multilytogènes de streptocoques du groupe N. *Le Lait*, 63: 102-115.
- CHOPIN, M.-C., A. MOILLO-BATT e A. ROUAULT, 1985. Plasmid-mediated U.V. - protection in *Streptococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*, 26: 243-245.
- CHRISTENSEN, V.W., 1972. Recent developments in starter techniques. *Dairy Industry*, 37: 655-671.
- CITTI, J.E., W.E. SANDINE e P.R. ELLIKER, 1965. Comparison of slow and fast acid producing *Streptococcus lactis*. *Journal of Dairy Science*, 48: 14-18.

- CLEWELL, D.B., Y. YAGI, G.M. DUNNY e S.K. SCHULTZ, 1974. Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. *Journal of Bacteriology*, 117: 283-289.
- COGAN, T.M., 1980. Le levains lactiques mésophiles. Une revue. *Le Lait*, 60: 397-425.
- COLLINS, E.B., 1955. Action of bacteriophage on mixed strain cultures. III. Strain domination due to the action of bacteriophage and variations in the acid production of secondary growth bacteria. *Applied Microbiology*, 3: 137-140.
- COLLINS, E.B., 1956. Host-controlled variations in bacteriophages active against lactic streptococci. *Virology*, 2: 261-271.
- COLLINS, E.B., 1958. Changes in the bacteriophage sensitivity of lactic streptococci. *Journal of Dairy Science*, 41: 41-48.
- COLLINS, E.B., 1962. Behaviour and use of lactic streptococci and their bacteriophages. *Journal of Dairy Science*, 45: 552-558.
- COLLINS, E.B., F.E. NELSON e C.E. PARMELEE, 1950. Acetate and oleate requirements of the lactic group of streptococci. *Journal of Bacteriology*, 59: 69-74.



- CORDS, B.R., L.L. MCKAY e P. GUERRY, 1974. Extrachromosomal elements in group N streptococci. *Journal of Bacteriology*, 117: 1149-1152.
- COX, W.A., 1977. Characteristics and use of starter cultures in the manufacture of hard pressed cheese. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 30: 5-15.
- CROW, V.L., G.P. DAVEY, L.E. PEARCE e T.D. THOMAS, 1983. Plasmid linkage of the D-tagatose 6-phosphate pathway in *Streptococcus lactis*: effect on lactose and galactose metabolism. *Journal of Bacteriology*, 153: 76-83.
- CZULAK, J. e B.P. KEOGH, 1957. Trials of phage resisting medium. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 12: 54-55.
- CZULAK, J., D.J. BANT, S.C. BLYTHE e J.B. GRACE, 1979. A new cheese starter system. *Dairy Industries International*, 44: 17-19.
- DACRE, J.C., 1958. Characteristics of a presumptive *Pediococcus* occurring in New Zealand Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 25: 409-413.
- DALY, C., 1983. The use of mesophilic cultures in the dairy industry. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49: 297-312.

- DALY, C. e G.F. FITZGERALD, 1982. Bacteriophage DNA restriction and the lactic streptococci. In: SCHLESSINGER, D., Ed. *Microbiology-1982*. Washington, D.C., American Society for Microbiology, p. 213-216.
- DANIELL, S.D. e W.E. SANDINE, 1981. Development and commercial use of a multiple strain starter. *Journal of Dairy Science*, 64: 407-415.
- DAVEY, G.P., 1984. Plasmid associated with diplococcin production in *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 895-896.
- DAVEY, G.P. e L.E. PEARCE, 1980. The use of *Streptococcus cremoris* strains cured of diplococcin production as cheese starters. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 15: 51-57.
- DAVIES, F.L. e M.J. GASSON, 1981. Reviews of the progress of dairy science: genetics of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Research*, 48: 363-376.
- DAVIES, F.L. e M. GASSON, 1983. Genetics of dairy cultures. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 7: 49-60.

- DAVIES, F.L. e M.J. GASSON, 1984. Bacteriophages of dairy lactic-acid bacteria. In: DAVIES, F.L. e B.A. LAW, Eds.: *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. London, Elsevier Applied Science Publishers, p. 127-151.
- DAVIES, F.L., H.M. UNDERWOOD e M.J. GASSON, 1981. The value of plasmid profiles for strain identification in lactic streptococci and the relationship between *Streptococcus lactis* 712, ML<sub>3</sub> and C<sub>2</sub>. *Journal of Applied Bacteriology*, 51: 325-337.
- DAVIS, J.G., 1965. *Cheese. Vol. I: Basic Technology*. London, Churchill, 463 p.
- DE VOS, W.M., H.M. UNDERWOOD e F.L. DAVIES, 1984. Plasmid encoded bacteriophage resistance in *Streptococcus cremoris* SK 11. *FEMS Microbiology Letters*, 23: 175-178.
- DUTTA, S.M., R.K. KUILA, B.C. ARORA e B. RANGANATHAN, 1972. Effect of incubation temperature on acid and flavour production in milk by lactic acid bacteria. *Journal of Milk and Food Technology*, 35: 242-244.
- EDDY, D. e V. RAYFIELD, 1978. Frozen concentrated starters for direct inoculation in the cheese vat. In: HULL, R.R., Ed. *Factory Derived Cheese Starters*. Proceeding of a meeting organised by The Dairy Research Laboratory Division of Food Research, CSIRO and The Australian Dairy Corporation. Hightett, Victoria, Australia, p. 36-38.

- EFSTATHIOU, J.D. e L.L. MCKAY, 1976. Plasmids in *Streptococcus lactis*: evidence that lactose metabolism and proteinase activity are plasmid linked. *Applied and Environmental Microbiology*, 32: 28-44.
- EFSTATHIOU, J.D. e L.L. MCKAY, 1977. Inorganic salts resistance associated with a lactose fermenting plasmid in *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 130: 257-265.
- EHRlich, S.D., B. NIAUDET e B. MICHEL, 1982. In: HOFschNEIDER, P.H. e V. GOEBEL, Eds. *Gene Cloning in Organisms Other Than E. coli*. New York, Heidelberg, Berlin. Springer-Verlag, p. 19-29. Apud: SIMON, D., A. ROUAULT e M.-C. CHOPIN. Protoplast transformation of group N streptococci with cryptic plasmids. *FEMS Microbiology Letters*, 26: 239-241.
- ELLIKER, P.R., 1951. The problem of bacteriophage in the dairy industry. *Journal of Milk and Food Technology*, 14: 13-16.
- ENGEL, G., K.E. MILCZWESKI e A. LEMBKE, 1975. Versuche zur Differenzierung von Phagen der *Streptococcus lactis*-und *cremoris* - Gruppe: Bakterianspektrum, serologische Beziehungen und morphologische Kriterien. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber*, 27: 25-47.
- ERICKSON, R.J., 1980. Apud: DAVIES, F.L. e M. J. GASSON, 1981. Reviews of the progress of dairy science: genetics of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Research*, 48: 363-376.

- EXTERKATE, F.A., 1976. The proteolytic system of a slow lactic-acid-producing variant of *Streptococcus cremoris* HP. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 30: 3-8.
- FITZGERALD, G.F., C. DALY, L.R. BROWN e T. R. GINGERAS, 1982. SerFI: a new sequence - specific endonuclease from *Streptococcus cremoris*. *Nucleic Acid Research*, 10: 8171-8179.
- FOSTER, E.M., F.E. NELSON, M.L. SPECK, R.N. DOETSCH e J.C. OLSON, 1957. *Dairy Microbiology*. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, Inc., 490 p.
- FRANKE, A.E. e D.B. CLEWELL, 1980. Evidence for conjugal transfer of a *Streptococcus faecalis* transposon (TN 916) from a chromosomal site in the absence of plasmid DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 45: 77-80.
- FRYER, F.F. e M.E. SHARPE, 1966. Pediococci in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 33: 325-331.
- FUCHS, P.G., J. ZAYDEL e W.T. DOBRZANSKI, 1975. Possible plasmid nature of the determinant for production of the antibiotic nisin in some strains of *Streptococcus lactis*. *Journal of General Microbiology*, 88: 189-192.
- GARCIA, S., 1984. Isolamento e seleção de culturas lácticas para a fabricação de queijos. Campinas, UNICAMP, 89 p. (Tese de Mestrado).
- GASSON, M.J., 1980. Production, regeneration and fusion of protoplasts in lactic streptococci. *FEMS Microbiology Letters*, 9: 99-102.

- GASSON, M.J., 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCD0 712 and other lactic streptococci after protoplast induced curing. *Journal of Bacteriology*, 154: 1-9.
- GASSON, M.J., 1984. Transfer of sucrose fermenting ability, nisin resistance and nisin production into *Streptococcus lactis* 712. *FEMS Microbiology Letters*, 21: 7-10.
- GASSON, M.J. e F.L. DAVIES, 1980 a. Prophage-cured derivatives of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 40: 964-966.
- GASSON, M.J. e F.L. DAVIES, 1980 b. Conjugal transfer of the drug resistance plasmid pAMB in the lactic streptococci. *FEMS Microbiology Letters*, 7: 51-53.
- GASSON, M.J. e F.L. DAVIES, 1980 c. High - frequency conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation. *Journal of Bacteriology*, 143: 1260-1264.
- GASSON, M.J. e F.L. DAVIES, 1984. The genetics of dairy lactic-acid bacteria. In: DAVIES, F.L. e LAW, B.A., Eds. *Advances in the microbiology and biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. London and New York, Elsevier Applied Science Publishers, p. 99-125.
- GEIS, A., 1982. Transfection of protoplasts of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *FEMS Microbiology Letters*, 15: 119-122.

- GEIS, A., J. SHING e M. TEUBER, 1983. Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 205-211.
- GINGERAS, T.R. e J. BROOKS, 1983. Cloned restriction modification system from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 80: 402-406.
- GEORGHIOU, D., S.H. PHUA e E. TERZAGHI, 1981. Curing of a lysogenic strain of *Streptococcus cremoris* and characterization of the temperate bacteriophage. *Journal of General Microbiology*, 122: 295-303.
- GORDON, J.F. e N. SHAPTON, 1977. Characteristics and use of starters for the manufacture of yoghurt, cottage cheese, cultured buttermilk and other fermented foods. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 30: 15-22.
- GRAHAM, D.M., C.P. PARMELEE e F.E. NELSON, 1952. The carrier state of lactic streptococcus bacteriophages. *Journal of Dairy Science*, 35: 813-822.
- GUDKOV, A.V., G.D. PERFIL'EV, L.S. MATEVOSYAN, V.M. DOKURIN e V.I. CHEPKOVA, 1980. Physiological and biochemical characteristics of lactic acid bacteria present in cheese starters. *Dairy Science Abstracts*, 42: 46.
- GULSTROM, T.J., L.E. PEARCE, W.E. SANDINE e P.R. ELLIKER, 1979. Evaluation of commercial phage inhibitory media. *Journal of Dairy Science*, 62: 208-221.

- HAMMOND, L.A., 1976. Starters and microorganisms in cheesemaking. *Food Technology, Australia*, 28: 11-13.
- HARGROVE, R.E., 1959. A simple method for eliminating and controlling bacteriophage in lactic starters. *Journal of Dairy Science*, 42: 906.
- HARGROVE, R.E., F.E. McDONOUGH e R.P. TITSLER, 1961. Phosphate heat treatment of milk to prevent bacteriophage proliferation in lactic cultures. *Journal of Dairy Science*, 44: 1799-1810.
- HARRIGAN, W.F. e E. McCANCE, 1976. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. London, Academic Press, 452 p.
- HARRIS-WARWICK, R.M., Y. ELKANA, S.D. ERLICH e J. LEDERBERG, 1975. Electrophoretic separation of *Bacillus subtilis* genes. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 72: 2207-2211.
- HAYES, W., 1968. *The genetics of bacteria and their viruses*. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- HEAP, H.A. e A.W. JARVIS, 1980. A comparison of prolate and isometric headed lactic streptococcal bacteriophages. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 15: 75-81.
- HEAP, H.A. e R.C. LAWRENCE, 1976. The selection of starter strains for cheesemaking. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 11: 16-20.



- HEAP, H.A. e R.C. LAWRENCE, 1981. Recent modifications to the New Zealand activity test for Cheddar cheese starters. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 15: 91-94.
- HEAP, H.A., G.K. LIMSOVTIN e R.C. LAWRENCE, 1978. Contribution of *Streptococcus lactis* strains in raw milk to phage infection in commercial cheese factories. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 13: 16-22.
- HENNING, D.R.W., W.E. SANDINE, P.R. ELLIKER e H. HAYS, 1965. Studies with a bacteriophage inhibitory medium. *Journal of Food Technology*, 28: 273-277.
- HENNING, D.R.W., C.H. BLACK, W.E. SANDINE e P.R. ELLIKER, 1968. Host-range studies of lactic streptococcal bacteriophages. *Journal of Dairy Science*, 51: 16-21.
- HINTERMANN, G., H.M. FISCHER, R. CRAMERI e R. HUTTER, 1981. Simple procedure for distinguishing CCC, OC and L forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. *Plasmid*, 5: 371-373.
- HUGGINS, A.R., 1984. Progress in dairy starter culture technology. *Food Technology*, 38: 41-50.
- HUGGINS, A.R. e W.E. SANDINE, 1977. Incidence and properties of temperate bacteriophages induced from lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 33: 184-191.

- HUGGINS, A.R. e W.E. SANDINE, 1979. Differentiation of fast and slow milk - coagulating isolates of lactic streptococci. *Journal of Dairy Science*, 622 (Suppl. 1): 70.
- HULL, R.R., 1977 a. Methods for monitoring bacteriophage in cheese factories. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 32: 63-65.
- HULL, R.R., 1977 b. Control of bacteriophage in cheese factories. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 32: 65-66.
- HULL, R.R., 1978. Methods of monitoring for bacteriophage in cheese manufacture. In: *Factory Derived Cheese Starters*.
- HULL, R.R., Ed. Proceedings of a meeting organized by The Dairy Research Laboratory Division of Food Research, CSIRO, and The Australian Dairy Corporation. Highett, Australia, 68 p.
- HULL, R.R., 1983. Factory - derived starter cultures for the control of bacteriophage in cheese manufacture. *Australian Journal of Dairy Technology*, Dec. 149-154.
- HULL, R.R. e A.R. BROOKE, 1982. Bacteriophages more active against Cheddar cheese starters in untreated milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 32: 143-146.

- HUNTER, G.J.E., 1943. Bacteriophages for *Streptococcus cremoris*. Phage development at various temperatures. *Journal of Dairy Research*, 13: 136-145.
- HURST, A. e J.M. STUBBS, 1969. Electron microscopic study of membranes and walls of bacteria and changes occurring during growth initiation. *Journal of Bacteriology*, 97: 1466-1479.
- INTERNATIONAL DAIRY FERMENTATION, 1980. Starters in manufacture of cheese. 2. Factors affecting the results of an activity test of mesophilic cheese starters. *Bulletin IDF* (129): 5-9.
- JARVIS, A.W., 1977. The serological differentiation of lactic streptococcal bacteriophage. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 12: 176-181.
- JARVIS, A.W., 1978. Serological studies of a host range mutant of a lactic streptococcal bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 36: 785-789.
- JARVIS, A.W., 1981. The use of whey derived phage-resistant starter strains in New Zealand cheese plants. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 16: 25-31.
- JARVIS, A.W., 1982. Multiple lysogeny in lactic streptococci. *XXIth International Dairy Congress, Moscow*, 1: 314.

- JARVIS, A.W., 1984 a. Differentiation of lactic streptococcal phages into phage species by DNA-DNA homology. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 345-349.
- JARVIS, A.W., 1984 b. DNA-DNA homology between lactic streptococci and their temperate acid lytic phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 1031-1038.
- KEMPLER, G.M. e L.L. MCKAY, 1979. Genetic evidence for plasmid-linked lactose metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 37: 1041-1043.
- KEMPLER, G.N. e L.L. MCKAY, 1981. Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Journal of Dairy Science*, 64: 1527-1539.
- KEOGH, B.P., 1972. A re-assessment of the starter rotation system. *Australian Journal of Dairy Technology*, 27: 86-87.
- KEOGH, B.P., 1973. Adsorption, latent period and burst size of phages of some strains of lactic streptococci. *Journal of Dairy Research*, 40: 303-309.
- KEOGH, B.P., 1980. Appraisal of media and methods of assay of bacteriophages of lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 40: 798-802.

- KEOGH, B.P. e P.D. SHIMMIN, 1969. An inducible antibacterial agent produced by a strain of *Streptococcus cremoris*. *Journal of Dairy Research*, 36: 87-93.
- KEOGH, B.P. e P.D. SHIMMIN, 1974. Morphology of the bacteriophage of lactic streptococci. *Applied Microbiology*, 27: 411-415.
- KEOGH, B.P. e G. PETTINGILL, 1983. Adsorption of bacteriophage eb 7 on *Streptococcus cremoris* EB 7. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 1946-1948.
- KING, W.R., E.B. COLLINS e E.L. BARRETT, 1983. Frequencies of bacteriophage-resistant and show acid producing variants of *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 1481-1485.
- KLAENHAMMER, T.R., 1984. Interactions of bacteriophages with lactic streptococci. *Advances in Applied Microbiology*, 30: 1-29.
- KLAENHAMMER, T.R. e L.L. MCKAY, 1976. Isolation and examination of transducing bacteriophage from *Streptococcus lactis* C<sub>2</sub>. *Journal of Dairy Science*, 59: 396-404.
- KLAENHAMMER, T.R., L.L. MCKAY e K.A. BALDWIN, 1978. Improved lysis of group N streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 35: 592-600.

- KLIMOVSKII, I.I., V.I. ZVYAGINTSEN, A.V. GUDKOV e Z.P. MEDVEDEVA, 1973. Selection of strains in the formulation of starters. *Dairy Science Abstracts*, 35: 135.
- KOK, J., J.M.B.M. van der VOSSEN e G. VENEMA, 1984. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 726-731.
- KONDO, J.K. e L.L. MCKAY, 1982. Transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 1213-1215.
- KONDO, J.K. e L.L. MCKAY, 1983. Parameters affecting plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts. *Journal of Dairy Science*, Suppl. 1, 66: 56.
- KONDO, J.K. e L.L. MCKAY, 1984. Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts: optimization and use in molecular cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 252-259.
- KOSIKOWSKI, F., 1977. *Cheese and fermented milk foods*. 2nd. ed. Ann Arbor, Edwards Bros, inc.
- KOZAK, W., M. RAJCHERT-TRZPIL, J. ZADJEL e W.P. DOBRZANSKI, 1973. Lysogeny in lactic streptococci producing and not producing nisin. *Applied Microbiology*, 25: 305-308.

- KRETSCHMER, P.J., A.C.Y. CHANG e S. COHEN, 1975. Indirect selection of bacterial plasmids lacking identifiable phenotypic properties. *Journal of Bacteriology*, 124: 225-231.
- KRÜGER, D.H., S. HANSEN e C. SCHROEDER, 1980. Host-dependent modification of bacterial virus T3 affecting its adsorption ability. *Virology*, 102: 444-446.
- KRÜGER, D.H. e T.A. BICKLE, 1983. Bacteriophage survival: multiple mechanisms for avoiding the deoxyrinonucleic acid restriction systems of their hosts. *Microbiological Reviews*, 47: 345-360.
- KUHL, S.A., L.D. LARSEN e L.L. MCKAY, 1979. Plasmid profiles of lactose - negative and proteinase - deficient mutants of *Streptococcus lactis* C10, ML3 and M18. *Applied and Environmental Microbiology*, 37: 1193-1195.
- LANGELLA, P., 1982. Amélioration des techniques de détermination des plasmides de streptocoques lactiques mésophiles. Marseille, Université d'Aix-Marseille II, Faculté de Pharmacie, 25 p. (D.E.A. de Microbiologie).
- LARSEN, L.D. e L.L. MCKAY, 1978. Isolation and characterization of plasmid DNA in *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 36: 944-952.

- LAW, B.A. e J. KOLSTAD, 1983. Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49: 225-245.
- LAWRENCE, R.C., 1978. Action of bacteriophage on lactic acid bacteria: consequence and protection. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 13: 129-136.
- LAWRENCE, R.C. e L.E. PEARCE, 1972. Cheese starters under control. *Dairy Industry*, 7: 73-78.
- LAWRENCE, R.C. e T.D. THOMAS, 1979. The fermentation of milk by lactic acid bacteria. *29<sup>th</sup> Symposium of the Society for General Microbiology*, Cambridge University Press, 187 p.
- LAWRENCE, R.C., T.D. THOMAS e B.E. TERZAGHI, 1976. Reviews of the progress of dairy science: cheese starters. *Journal of Dairy Research*, 43: 141-193.
- LAWRENCE, R.C., H.A. HEAP, G. LIMSOVTIN e A.W. JARVIS, 1978. Cheddar cheese starters: Current knowledge and practices of phage characteristics and strain selection. *Journal of Dairy Science*, 61: 1181-1191.
- LeBLANC, D.J.R., R.J. HAWLEY, L.N. LEE e E.J. St. MARTIN, 1978. "Conjugal" transfer of plasmid DNA among oral streptococci. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 75: 3484-3487.



- LeBLANC, D.J., V.L. CROW, L.N. LEE e C.F. GARON, 1979. Influence of the lactose plasmid on the metabolism of galactose by *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 137: 878-884.
- LeBLANC, D.J., V.L. CROW e L.N. LEE, 1980. Plasmid mediated carbohydrate catabolic enzymes among strains of *Streptococcus lactis*. In: STUTTARD, C. e K.R. ROZEE, Eds. *Plasmids and transposons. Environmental effects and maintenance mechanisms*. New York, Academic Press, Inc., p. 31-41.
- LeBLANC, D.J. e L.N. LEE, 1984. Physical and genetic analyses of streptococcal plasmid pAMB1 and cloning of its replication region. *Journal of Bacteriology*, 157: 445-453.
- LEGG, W.M., 1973. The selection and maintenance of starters for non cheddar cheese varieties. *Dairy Science Abstracts*, 35: 54.
- LEMBKE, A., F. WASSERFALL e G. ENGEL, 1972. Studien über Käse-  
sereifung. 3. Phagentypisierung der für die Käsehertellung  
selektivierten hochwertigen Reinkulturen. *Kiel. Milch-  
wirtsch. Forschungsber.*, 24: 409-421.
- LEMBKE, J., V. KRUSCH, A. LOMPE e M. TEUBER, 1980. Isolation  
and ultrastructure of bacteriophages of group N (lactic)  
streptococci. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkden-  
de Infektionskrankheiten und Hygiene. Originelle Reihe C*,  
1: 79-91.

- LEMBKE, J. e M. TEUBER, 1981. Setotyping of morphologically identical bacteriophage of lactic streptococci by immunoelectron microscope. *Milchwissenschaft*, 36: 10-12.
- LEMBKE, J. e M. TEUBER, 1982. XXI International Dairy Congress, Moscow, 1 (2): 334. Apud: DAVIES, F.L. e B.A. LAW, Eds. *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, London, New York, Elsevier Applied Science Publishers, p. 99-126.
- LIMSOWTIN, G.K.Y. e B.E. TERZAGHI, 1976. Phage resistant mutants: their selection and use in cheese factories. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 11: 251-256.
- LIMSOWTIN, G.K.Y. e B.E. TERZAGHI, 1977. Characterization of bacterial isolates from a phage - carrying culture of *S. cremoris*. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 12: 22-28.
- LIMSOWTIN, G.K.Y., H.A. HEAP e R.C. LAWRENCE, 1977. A multiple starter concept for cheesemaking. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 12: 101-106.
- LIMSOWTIN, G.K.Y., H.A. HEAP e R.C. LAWRENCE, 1978. Heterogeneity among strains of lactic streptococci. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 13: 1-3.

- LOOF, M., J. LEMBKE e M. TEUBER, 1983. Characterization of the genome of the *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* bacteriophage P00 8 wide - spread in german cheese factories. *Systematic and Applied Microbiology*, 4: 413-423.
- LOWRIE, R.J., 1974. Lysogenic strains of group N lactic streptococci. *Applied Microbiology*, 27: 210-217.
- LOWRIE, R.J. e L.E. PEARCE, 1971 a. The plating efficiency of bacteriophages of lactic streptococci. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 6: 166-171.
- LOWRIE, R.J. e L.E. PEARCE, 1971 b. Use of indicator strains for the assay of bacteriophages of lactic streptococci. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 6: 192.
- LURIA, S.E., 1953. Host-induced modification of viruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 18: 237-244.
- MACRINA, F.L., P.H. WOOD e K.R. JONES, 1980. Genetic transformation of *Streptococcus sanguis* (Challis) with cryptic plasmids from *Streptococcus faecalis*. *Infection and Immunity*, 28: 692-699.
- MACRINA, F.L., C.L. KEELER, Jr., K.R. JONES e P.H. WOOD, 1980. Molecular characterization of unique deletion mutants of the streptococcal plasmid pAM $\beta$ 1. *Plasmid*, 4: 8-16.

- MACRINA, F.L., J.A. TOBIAN, K.R. JONES e R.P. EVANS, 1982. Molecular cloning in the streptococci. In: HOLLAENDER, A., R. DEMOSS, S. KAPLAN, J. KONISKY, D. SAVAGE e R. WOLFE, Eds. *Genetic engineering of microorganisms for chemicals*. New York, Plenum, p. 195-210.
- MACRINA, F.L., R.P. EVANS, J.A. TOBIAN, D.L. HARTLEY, D.B. CLEDWELL e K.R. JONES, 1983. Novel shuttle plasmid vehicles for *Escherichia - Streptococcus* transgeneric cloning. *Gene*, 25: 145-150.
- MALCOM, A.D.B., 1981. The use of restriction enzymes in genetic engineering. In: WILLIAMSON, R., Ed. *Genetic Engineering 2*. New York, Academic Press, p. 130-167.
- MANIATIS, T., E.F. TRITSCH e J. SAMBROOK, 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, Cold Spring Harbor, 545 p.
- MARCOS, A., M.A. STEBAN, J. ESPEJO, P. MARTINEZ e M.T. MUÑOZ, 1977. "Screening" de las cepas proteolíticas del queso tipo Manchego y acción de las proteasas de las suspensiones de células sobre la  $\alpha_s$  e  $\beta$ -caseína. *Archivos de Zootecnia*, 26: 189-199.
- McCLELLAND, M., 1981. The effect of sequence specific DNA methylation on restriction endonuclease cleavage. *Nucleic Acid Research*, 9: 5859-5866.

- McKAY, L.L., 1982. Regulation of lactose metabolism in dairy streptococci. In: DAVIES, R., Ed. *Developments in food microbiology-1*. Essex, England, Applied Science Publishers Ltd. p. 153-182.
- McKAY, L.L., 1983. Functional properties of plasmidis in lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49: 259-274.
- McKAY, L.L., 1984. Genetic modifications of lactic acid bacteria: plasmid directed functions and development of gene transfer systems. In: S.F.M., Ed. *Genétique des micro-organismes industriels*. 9<sup>ème</sup> Colloque de microbiologie industrielle et biotechnologie. Paris, p. 141-154.
- McKAY, L.L. e K.A. BALDWIN, 1973. Induction of prophage in *Streptococcus lactis* C<sub>2</sub> by ultraviolet irradiation. *Applied Microbiology*, 25: 682-684.
- McKAY, L.L. e K.A. BALDWIN, 1974. Simultaneous loss of proteinase and lactose - utilizing enzyme activities in *Streptococcus lactis* and reserval of loss by transduction. *Applied Microbiology*, 28: 342-346.
- McKAY, L.L. e K.A. BALDWIN, 1975. Plasmid distribution and evidence for a proteinase plasmid in *Streptococcus lactis* C<sub>2</sub>. *Applied Microbiology*, 29: 546-548.

- McKAY, L.L. e K.A. BALDWIN, 1984. Conjugative 40 - megadalton plasmid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* DRC3 is associated with resistance to nisin and bacteriophage. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 68-74.
- McKAY, L.L., K.A. BALDWIN e J.D. EFSTATHIOU, 1976. Transductional evidence for plasmid linkage of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C<sub>2</sub>. *Applied and Environmental Microbiology*, 32: 45-57.
- McKAY, L.L., K.A. BALDWIN e P.J. WALSH, 1980. Conjugal transfer of genetic information in group N streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 40: 84-91.
- MESELSON, M., Y. ROBERT e J. HEYWOOD, 1972. Restriction and modification of DNA. *Annual Review of Biochemistry*, 41: 447-466.
- MEYERS, J.A., D. SANCHEZ, L.P. ELWELL e S. FALKOW, 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*, 127: 1529-1537.
- MOLSKNESS, T.A., W.E. SANDINE e L.R. BROWN, 1974. Characterization of lac<sup>+</sup> transductants of *Streptococcus lactis*. *Applied Microbiology*, 28: 753-758.

- MULLAN, W.M.A., C. DALY e P.F. FOX, 1981. Effect of cheesema-  
king temperatures on the interactions of lactic strep-  
tococci and their phages. *Journal of Dairy Research*, 48:  
465-471.
- MURRAY, K. e N.E. MURRAY, 1975. Phage Lambda receptor chromo-  
some for DNA fragments made with restriction endonuclease  
III of *Haemophilus influenzae* and restriction endonuclease  
I of *E. coli*. *Journal of Molecular Biology*, 98: 551-564.
- NICHOLS, A.A. e M. HOYLE, 1949. Bacteriophages in typing lac-  
tic streptococci. *Journal of Dairy Research*, 16: 167-208.
- NOVICK, R.P., 1969. Extrachromosomal inheritance in bacteria.  
*Bacteriology Reviews*, 35: 210-263.
- NOVICK, R.P., C. SANCHEZ-RIVAS, A. GRUSS e I. EDELMAN, 1980.  
Involvement of the cell envelop in plasmid maintenance: plas-  
mid curing during the regeneration of protoplasts. *Plasmid*,  
3: 348-358.
- NYIENDO, J., R.J. SEIDLER, W.E. SANDINE e P.R. ELLIKER, 1974.  
Preparation and storage of high-titer lactic *Streptococcus*.  
bacteriophages. *Applied Microbiology*, 27: 72-77.
- OKAMOTO, T., Y. FUJITA e R. IRIE, 1983. Fusion of protoplasts  
of *Streptococcus lactis*. *Agricultural and Biological Che-  
mistry*, 47: 2675-2676.

- ORAM, J.D., 1971. Isolation and properties of a phage receptor substance from the plasma membrane of *Streptococcus lactis* ML3. *Journal of General Virology*, 13: 59-71.
- ORAM, J.D. e B. REITER, 1968. The adsorption of phage to group N streptococci: the specificity of adsorption and the location of phage receptor substances in cell-wall and plasma - membrane fractions. *Journal of General Virology*, 3: 103-119.
- ORBERG, P.K. e W.E. SANDINE, 1984. Microscale method for rapid isolation of covalently closed circular plasmid DNA from group N streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 677-680.
- OTTO, R., M. de VOS WILLEM e J. GAVRIELI, 1982. Plasmid DNA in *Streptococcus cremoris* Wg 2: influence of pH on selection in chemostats of a variant lacking a protease plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 1272-1277.
- OVERBY, A.J., 1976. Starter problems. *Danish Industrial World*, 1: 15-17.
- PARADA, J.L., M.I. LA VIA e A.J. SOLARI, 1984. Isolation of *Streptococcus lactis* bacteriophages and their interaction with the host cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 825-828.



- PARK, C. e L.L. MCKAY, 1975. Induction of prophage in lactic streptococci isolated from commercial dairy starter cultures. *Journal of Milk Technology*, 38: 594-597.
- PARK, Y.H, e L.L. MCKAY, 1982. Distinct galactoses phosphoenolpyruvate - dependent phosphotransferase system in *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 149: 420-425.
- PARMELLEEE, C.E., P.H. CARR e F.E. NELSON, 1949. Electron microscope studies of bacteriophage active against *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 57: 391-397.
- PEARCE, L.E., 1969. Activity test for cheese starter cultures. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 4: 246-247.
- PEARCE, L.E., 1978. The effect of host - controlled modification on the replication rate of a lactic streptococcal bacteriophage. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 13: 166-171.
- PEARCE, L.E., G.K.Y. LIMSOWTIN e A.M. CRAWFORD, 1970. Bacteriophage multiplication characteristics in Cheddar cheesemaking. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 5: 145-150.
- PEARCE, L.E., N.A. SKIPPER e B.J. JARVIS, 1974. Proteinase activity in slow lactic acid - producing variants of *Streptococcus lactis*. *Applied Microbiology*, 27: 933-937.

- PECHMANN, H. e M. TEUBER, 1980. Plasmid pattern of group N (lactic) streptococci. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 10, 1: 133-136.
- PORTNOY, D.A., S.L. MOSELEY e S. FALKOW, 1981. Characterization of plasmids and plasmid associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 31: 775-782.
- PORUBCAN, R.S. e R.L. SELLARS, 1979. Lactic starter cultures concentrates. In: PEPLER, H.J. e D. PERLMAN, Eds., *Microbial Technology, Vol. 1. Microbial Processes*. London, UK, Academic Press, Inc., 2nd ed., p. 59-92.
- POTTER, N.N. 1970. Host - induced changes in lactic streptococcal bacteriophages. *Journal of Dairy Science*, 53: 1358-1362.
- POTTER, N.N. e F.E. NELSON, 1952. Effects of calcium on proliferation of lactic *Streptococcus* bacteriophage. II. Studies of optimum concentrations in a partially defined medium. *Journal of Bacteriology*, 64: 113-119.
- POTTER, N.N. e F.E. NELSON, 1953. Role of calcium and related ions in proliferation of lactic streptococcus bacteriophage. *Iowa Agricultural Experiment Station, Ames, Iowa*, 66: 508-516.

- REINBOLD, G.W., M.S. REDDY e E.G. HAMMOND, 1982. Ultrastructures of bacteriophages active against *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Food Protection*, 45: 119-124.
- REITER, B., 1949. Lysogenic strains of lactic streptococci. *Nature*, London, 164: 667-668.
- REITER, B., 1956. Apud: SANDINE, W.E., 1980. *Lactic starter culture technology*. Pfizer Cheese Monographs, Vol. VI, New York, Pfizer Inc., 38 p.
- REITER, B., 1973. Some thoughts on cheese starters. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 26: 3-21.
- REITER, B. e A. MØLLER-MADSEN, 1963. Reviews of the progress of dairy science. Section B. Cheese and Dairy Starters. *Journal of Dairy Research*, 30: 419-455.
- REITER, B. e M. KIRIKOVA, 1976. The isolation of a lysogenic strains from a multiple strain starter culture. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 29: 221-225.
- REYROLLE, J., M.-C. CHOPIN, F. LETELLIER e G. NOVEL, 1982. Lysogenic strains of lactic acid streptococci and lytic spectra of their temperate bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 349-356.

- RICHARDSON, G.H., 1984. Proteinase negative cultures for cheese-making. *Cultured Dairy Production Journal*, 19: 6-9.
- RICHARDSON, G.H., C.T. CHENG e R. YOUNG, 1976. Lactic bulk culture system utilizing whey - based bacteriophage inhibitory medium and pH control. I. Applicability to American style cheese. *Journal of Dairy Science*, 60: 378-386.
- RICHARDSON, G.H., G.L. HONG e C.A. ERNSTROM, 1980. Defined single strains of lactic streptococci in bulk culture for Cheddar and Monterey cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*, 63: 1981-1986.
- RICHARDSON, G.H., C.A. ERNSTROM e C. DALY, 1983. Proteinase negative variants of *Streptococcus cremoris* for cheese starters. *Journal of Dairy Science*, 66: 2278-2286.
- SANDERS, M.E. e T.R. KLAENHAMMER, 1980. Restriction and modification in group N streptococci: effect of heat on development of modified lytic bacteriophage. *Applied and Environmental Microbiology*, 40: 500-506.
- SANDERS, M.E. e T.R. KLAENHAMMER, 1981. Evidence for plasmid linkage of restriction and modification in *Streptococcus cremoris* KH. *Applied and Environmental Microbiology*, 42: 944-950.

- SANDERS, M.E. e T.R. KLAENHAMMER, 1983. Characterization of phage-sensitive mutants from a phage-insensitive strain of *Streptococcus lactis*: evidence for a plasmid determinant that prevents phage adsorption. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 1125-1133.
- SANDERS, M.E. e T.R. KLAENHAMMER, 1984. Phage resistance in a phage-insensitive strain of *Streptococcus lactis*: temperature-dependent phage development and host-controlled phage replication. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 979-985.
- SANDINE, W.E., 1977. New techniques in handling lactic cultures to enhance their performance. *Journal of Dairy Science*, 60: 822-827.
- SANDINE, W.E., 1980. *Lactic starter culture technology*. Pfizer Cheese Monographs. Vol. VI. New York, Pfizer Inc. 38 p.
- SANDINE, W.E. e J.W. AYRES, 1981. Method and starter compositions for the growth of acid producing bacteria and bacterial compositions produced thereby. US Pat. 4,282,255.
- SCHERWITZ, K.M., K.A. BALDWIN e L.L. MCKAY, 1983. Plasmid linkage of a bacteriocin-like substance in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* strain VM4: transferability to *Streptococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 1506-1512.

- SHARPE, M.E., 1979. Lactic acid bacteria in the dairy industry. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 32: 9-17.
- SHARPE, M.E. e T.F. FRYER, 1966. Identification of the lactic acid bacteria. In: GIBBS, B.M., 1966. *Identification methods for microbiologists*. London, Academic Press, 145 p.
- SIMON, D., 1984. Transformation de protoplastes de streptococques lactiques par de l'ADN plasmidique. Université de Rennes 1, 21 p. (DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire).
- SIMON, D., A. ROUAULT e M.-C. CHOPIN, 1985. Protoplast transformation of group N streptococci with cryptic plasmids. *FEMS Microbiology Letters*, 26: 239-241.
- SINHA, R.P., 1980. Alteration of host specificity to lytic bacteriophages in *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 40: 326-332.
- SMILEY, M.B., 1980. Bacterial genetics, molecular biology and dairy cultures. *Nestlé Research News*. p. 39-53.
- SOZZI, T., 1972. Étude sur la préparation de ferments lactiques très actifs. *Le Lait*, 52: 454-465.
- SOZZI, T., 1973. The preparation of very active lactic cultures. *Le Lait*, 52: 454-465.

- SOZZI, T. e R. MARET, 1975. Isolement et quelques caractéristiques des bactériophages de *S. thermophilus* et de *L. helveticus* de ferments d'Emmental. *Le Lait*, 55: 269-288.
- SOZZI, T., R. MARET e J.M. POULIN, 1976. Study of plating efficiency of bacteriophages of thermophilic lactic acid bacteria on different media. *Applied and Environmental Microbiology*, 32: 131-137.
- SOZZI, T., J.M. POULIN e R. MARET, 1978. Effect of incubation temperature on the development of lactic acid bacteria and their phages. *Journal of Dairy Research*, 45: 259-265..
- SOZZI, T., H. BAUER, R. MARET e E. DENTAN, 1980. Some characteristic of fine phages capable of lysing a strain of *Streptococcus lactis*. *Milchwissenschaft*, 35: 17-20.
- SPECK, M.L., 1982. Starter culture growth and action in milk. *Journal of Dairy Science*, 45: 1281-1286.
- St. MARTIN, E.J., L.N. LEE e D.J. Le BLANC, 1982. Genetic analysis of carbohydrate metabolism in streptococci. In: SCHLESSINGER, D., Ed. *Microbiology*. Washington, D.C., American Society for Microbiology, p. 232-233.
- STADHOUDERS, J., 1974. Dairy starter cultures. *Milchwissenschaft*, 29: 329-337.

STADHOUDERS, J., 1975. Microbes in milk acid dairy products.

An ecological approach. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 29: 104-126.

STADHOUDERS, J. e F. HASSING, 1972. A standardized method of determining the activity of cheese starters. *Voedingsmidde-  
lentechnologie*, 3: 190-193.

SWARTLING, P.F., 1951. Biochemical and serological properties of some citric acid fermenting streptococci from milk and dairy products. *Journal of Dairy Research*, 18: 256-267.

TERZAGHI, B.E., 1976. Morphologies and host sensitivities of lactic streptococcal phages from cheese factories. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 11: 155-163.

TERZAGHI, B.E. e W.R. SANDINE, 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29: 807-813.

TERZAGHI, E.A. e B.E. TERZAGHI, 1978. Effect of lactose concentration on the efficiency of plating of bacteriophages on *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 35: 471-478.

TERZAGHI, B.E. e W.E. SANDINE, 1981. Bacteriophage production following exposure of lactic streptococci to ultraviolet radiation. *Journal of General Microbiology*, 122: 305-311.



- TEUBER, M. e J. LEMBKE, 1982. In: *Microbiology-1982*. SCHLES-  
SINGER, D., Ed. Washington, D.C., American Society for Mi-  
crobiology. Apud: DAVIES, F.L. e B.A. LAW, 1984. *Advances*  
*in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented*  
*Milk*. London, New York, Elsevier Applied Science Publishers,  
p. 99-126.
- TEUBER, M. e J. LEMBKE, 1983. The bacteriophage of lactic acid  
bacteria with emphasis on genetic aspects of group N strep-  
tococci. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49: 283-295.
- THOMAS, T.D. e R.J. LOWRIE, 1975. Starters and bacteriophages  
in lactic casein manufacture. I. Mixed strain starters. *Jour-  
nal of Milk and Food Technology*, 38: 275-278.
- THUNELL, R.K., W.E. SANDINE e F.W. BODYFELT, 1981. Phage-sensi-  
tive, multiple-strain starter approach to Cheddar cheese ma-  
king. *Journal of Dairy Science*, 2270-2277.
- TIKHONENKO, A.S., 1970. *Ultrastructure of bacterial viruses*.  
New York, Plenum Publishing Corp., 145 p.
- TSANEVA, K.P., 1976. Electron microscopy of virulent phages  
for *Streptococcus lactis*. *Applied and Environmental Micro-  
biology*, 31: 590-601.
- TUMERMAN, L. e B.H. WEBB, 1965. Coagulation of milk and pro-  
tein denaturation. In: WEBB, B.H. e A.H. JOHNSON. *Funda-  
mentals of Dairy Chemistry*. Westport, The AVI Publishing  
Company, Inc. p. 506-672.

- YANG, N.L. e W.E. SANDINE, 1979. Acid-producing activity of lyophilized lactic streptococcal cheese starter concentrates. *Journal of Dairy Science*, 62: 908-915.
- YU, R.S.-T., T.V. HUNG e A.A. AZAD, 1982. Rapid screening of highly purified plasmids in lactic streptococci. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 37: 99-103.
- YU, R.S.-T., T.V. HUNG e A.A. AZAD, 1983. Plasmid complement and sequence homology of some technological strains of lactic streptococci. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 38: 104-109.
- YUAN, R., 1981. Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. *Annual Review of Biochemistry*, 50: 285-315.
- WALSH, P.M. e L.L. MCKAY, 1981. Recombinant plasmid associated with cell aggregation and high-frequency conjugation of *Streptococcus lactis* ML 3. *Journal of Bacteriology*, 146: 937-944.
- WATANABE, K. e S. TAKESUE, 1972. The requirement for calcium in infection with *Lactobacillus* phage. *Journal of General Virology*, 17: 19-30.
- WHITEHEAD, H.R., 1953. Bacteriophage in cheese manufacture. *Bacteriological Reviews*, 17: 109-123.

- WHITEHEAD, H.R. e G.A. COX, 1935. The occurrence of bacteriophage in cultures of lactic streptococci. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 16: 319-320.
- WHITEHEAD, H.R. e G.A. COX, 1936. Bacteriophage phenomena in cultures of lactic streptococci. *Journal of Dairy Research*, 7: 55-62.
- WIGLEY, R.C., 1980. Advances in technology of bulk starter production and cheesemaking. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 33: 24-30.
- WILKOWSKE, H.H., F.E. NELSON e C.E. PARMELEE, 1954. Serological classification of bacteriophages active against lactic streptococci. *Applied Microbiology*, 2: 243-249.
- WRIGHT, S.L. e G.H. RICHARDSON, 1982. Optimization of whey-based or nonfat dry milk-based media for production of pH controlled bulk lactic cultures. *Journal of Dairy Science*, 65: 1882-1894.
- ZEHREN, V.L. e H.R. WHITEHEAD, 1954. Growth characteristics of streptococcal phages in relation to cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*, 37: 209-219.
- ZOTTOLA, E.A. e E.H. MARTH, 1966. Dry-blended phosphate-treated milk media for inhibition of bacteriophages active against lactic streptococci. *Journal of Dairy Science*, 49: 1343-1349.