

# LOS VIRUS BACTERIÓFAGOS EN LA INDUSTRIA GANADERA BOVINA



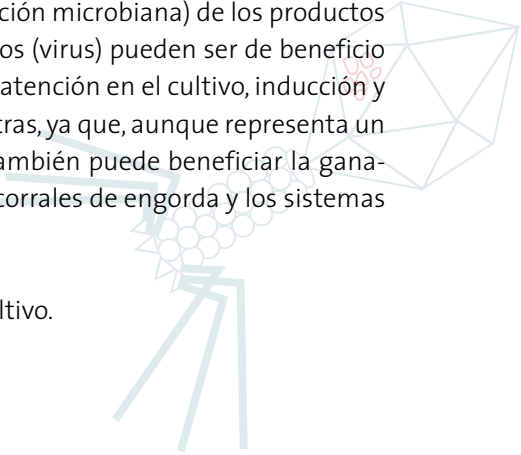
Ley de Coss, A.<sup>1</sup>, Cobos-Peralta, M.A.<sup>2</sup>, Aguirre-Medina, J.F.<sup>1</sup>, Marroquín-Agreda, F.J.<sup>1</sup>, Lerma-Molina, J.N.<sup>1</sup>, Posada-Cruz, S.<sup>1</sup>, Cerda-Ocaranza, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cuerpo Académico en Productividad de Agroecosistemas Tropicales, Facultad de Ciencias Agrícolas, *Campus IV*, Universidad Autónoma de Chiapas, Entronque Carretera Costera S/N, Huehuetán, Chiapas, México. CP. 36670. <sup>2</sup>Programa de Ganadería, *Campus Montecillo*, Colegio de Postgraduados Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP. 56230,

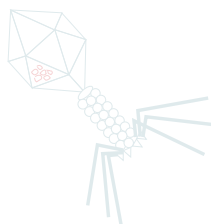
**Autor responsable:** aleycoss@gmail.com

## RESUMEN

Las bacterias fueron los primeros microorganismos en ser descubiertos en el rumen y, posteriormente, junto con los protozoarios y hongos fueron identificados como habitantes normales de este órgano. El rumen es un ecosistema anaerobio rico en biodiversidad microbiana (microflora, microfauna y, recientemente, virus bacteriófagos), que depende de factores internos y externos (tipo, frecuencia de la alimentación y manejo de los animales) para su mantenimiento y función. En bacterias similares (cepas ácido lácticas) a las que existen en el rumen, pero usadas en la industria lechera, se ha reportado la presencia de virus que hacen fallar parcial o totalmente la manufactura (fermentación microbiana) de los productos lácteos. Sin embargo, se ha elucidado que estos microorganismos (virus) pueden ser de beneficio en la industria ganadera; por ello, se ha retomado y enfocado la atención en el cultivo, inducción y aislamiento en los fagos que infectan a las bacterias lácticas y otras, ya que, aunque representa un problema en la industria lechera con afecciones económicas, también puede beneficiar la ganadería al eliminar bacterias que inducen acidosis ruminal en los corrales de engorda y los sistemas intensivos de producción lechera.



**Palabras clave:** Rumiantes, fagos, lácteos, bacterias, medio de cultivo.



## INTRODUCCIÓN

El estudio de los virus bacteriófagos o fagos es un aspecto que ha tomado relevancia, debido a que estos microorganismos causan daño al matar o inhibir a las bacterias ácido lácticas (BAL), tales como *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. y *Lactococcus* spp., entre otras, que son importantes para la industria lechera (producción de queso, de yogurt, de crema, etcétera). Estos fagos también pueden afectar negativamente las poblaciones de *Streptococcus bovis*, BAL, que están en el rumen de animales con acidosis ruminal subclínica (ARS), alimentados con dietas altas en carbohidratos de rápida fermentación o concentrados energéticos (>40% en la dieta). Con ello se busca favorecer el bienestar animal durante la engorda intensiva; por tanto, generar metodologías eficaces para el aislamiento y la evaluación de los fagos permite obtener herramientas necesarias para combatir problemas en los sistemas de producción pecuario, como la acidosis ruminal.

## Características de los bacteriófagos

Por definición, los bacteriófagos son virus que comen bacterias, de estructura sencilla y pequeña, capaces de introducirse en el interior de las células vivas específicas; su principal componente molecular es ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas (Joklik, 1997) (Figura 1 A). La caracterización de los bacteriófagos se ha llevado a cabo con estudios de microscopía, homología de ADN, perfiles proteicos, serología y parámetros con enzimas de restricción en el ADN, lo que ha llevado a nuevas clasificaciones de estos microorganismos (Moineau *et al.*, 1996). A pesar de la existencia de estos virus dentro de la industria lechera y en el ecosistema ruminal, con una población dinámica, las poblaciones en el rumen se mantienen altas por la significativa y continua lisis de bacterias (Klieve y Swain, 1993). Solamente se han identificado tres tipos de fagos que provocan problemas en la fermentación láctea: el A (de tallo contráctil y cabeza poliédrica), el B (de tallo flexible no contráctil y cabeza icosaédrica), y el C, de los cuales se han identificado algunos por estar en un estado lisogénico y aislados por medio de inducciones con fármacos, como la mitomicina C (Lockington *et al.*, 1988; Moineau *et al.*, 1996).

En su ciclo de vida los fagos requieren de la maquinaria de la célula hospedante para la replicación, transcripción y traducción de su código genético. Este ciclo de vida consta de la fase lisogénica, conocida también como atemperada, que inicia una vez que el virus inserta su genoma en el ADN de la bacteria, y el material genético se reproduce a la par de cada división celular, sin afectar la viabilidad de ambos y de una segunda fase lítica donde el fago domina la maquinaria biosintética de la bacteria, así como la replicación de ADN y la transcripción de ADN al ARN mensajero (ARNm), generando que la traducción del ARNm a biomoléculas (ácidos nucleicos y proteínas) se realice exclusivamente con el material genético del virus. El ciclo lítico termina con la muerte de la bacteria y la liberación de nuevos virus al medio ambiente (Joklik, 1997; Madigan, 2003) (Figura 1 B).

## Bacteriófagos en la industria lechera

Desde 1935 se ha reportado la existencia de fagos en BAL, iniciadores de la fermentación láctea con una población de entre  $10^6$  mL<sup>-1</sup> de leche a  $10^{10}$  mL<sup>-1</sup> de leche de UFP (unidades formadoras de placas líticas) (Teuber y Lembke, 1983; Moineau *et al.*, 1996). El continuo y extensivo uso de BAL, como *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp. en la fermentación

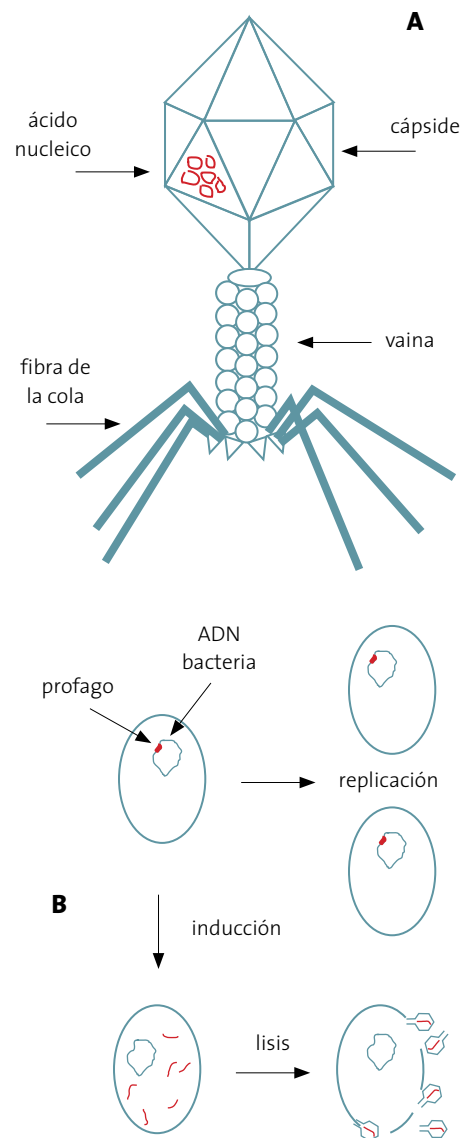


Figura 1. A: Componentes del bacteriófago. B: Ciclo de vida de un bacteriófago

y maduración de productos lácteos, ha permitido que estas cepas se encuentren limitadas por la contaminación de microorganismos; dentro de ellos, los virus bacteriófagos (Lapointe *et al.*, 1996; Saturio y Klaenhammer, 2002). Fagos específicos han sido aislados de cepas de lactococos y estreptococos que han acarreado problemas significativos en la industria (Saturio y Klaenhammer, 2002) en *Lactobacillus delbrueckii*, subespecies *bulgaricus* y *lactis*, utilizadas en la fabricación de queso y yogurt (Valasa *et al.*, 1995; Auad *et al.*, 1997). En *Lactococcus lactis* (Garbutt *et al.*, 1997; Shirley *et al.*, 1998) y en *S. thermophilicus* se han aislado cuatro subtipos del grupo B de fagos (Sheehan *et al.*, 1999; Saturio y Klaenhammer, 2002) en *Lactobacillus helveticus*, donde 57% de 37 cepas inducidas con mitomicina C presentaron fase lítica de fagos atemperados (Séchaud *et al.*, 1992; Carminati *et al.*, 1997). También se han aislado en estreptococos lácticos mesofílicos como: *S. cremoris*, *S. lactis*, subespecies *diacetylectis* (Reyrolle *et al.*, 1982), y en *Lactobacillus plantarum* (Caso *et al.*, 1994), *Lactobacillus casei* (Séchaud *et al.*, 1988) y, en general, en lactobacilos mesofílicos donde prevalecen las BAL. Por otra parte, los estados lisogénicos no son frecuentemente identificados cuando se utiliza un indicador de lisis como forma de detección, y solamente en 50% de las cepas inducidas se pueden obtener resultados cuando los bacteriófagos son expresados por lisis celular y microscopía electrónica.

Las principales fuentes de contaminación de fagos son leche fresca, cepas iniciadoras con virus en estado lisogénico y leche pasteurizada, debido a que éstos no pueden ser destruidos por pasteurización (Lapointe *et al.*, 1996; Bruttin *et al.*, 1997); también, el suero, la crema, productos finalizados, el equipo de trabajo (tinas, tanques),

los pisos y paredes, el aire de las instalaciones, el personal y su ropa (Teuber y Lembke, 1983; Garbut *et al.*, 1997). Los fagos en mención son virulentos (líticos), capaces de destruir el proceso de manufactura, con la consecuente pérdida de la capacidad fermentativa asociada con la lisis celular, causando pérdidas significativas en tiempo y producción (Brüssow *et al.*, 1994; Shirley *et al.*, 1998), aunque el efecto negativo dependerá del tipo de cepa iniciadora utilizada, ya que algunas cepas tienen un efecto menor y producen suficiente cantidad de ácido láctico o, en su caso, citrato, como en condiciones normales (Carminati *et al.* 1997; Maijala-Liisa *et al.*, 1986). Garbut *et al.* (1997) indican que existen algunos mecanismos que inducen resistencia a la infección por fagos; por ejemplo, *Lactococcus lactis* que está en el sistema de modificación/restricción, el aborto de la infección, las barreras que impiden la adsorción, y otros que bloquean aparentemente la penetración del ADN viral. Existen otros, con la especificidad de los fagos a situaciones donde las cepas que fueron sensibles a fagos atemperados y que no presentaron sensibilidad a fagos virulentos y/o viceversa, aunque existen algunas sensibles a ambas formas (Reyrolle *et al.*, 1982).

### Bacteriófagos en bacterias ruminales

Klieve *et al.* (1989) mencionan la presencia en bacterias ruminales, como *Serratia* spp., *S. bovis*, *S. durans*, *Bifidobacterium ruminale*, *Magnovov eadii*, *Methanobrevibacter* spp., *Fusobacterium* spp., y en *Selenomonas ruminantium* (Lickington *et al.*, 1988). Aunque no hay certeza de aislamientos en bacterias celulolíticas, se ha reportado la presencia de partículas víricas (desechos de fagos-cabezas y tallos solos) en *Butirivibrio fibrisolvens* (cepa AR14) y *Ruminococcus flavefaciens* (AR66), *Bacteroides ruminicola* y *Eubacterium ruminantium*, y material genético viral en *R. flavefaciens* (cepas AR17 y AR72); en todos los casos, los bacteriófagos identificados pertenecieron al grupo B (Klieve *et al.*, 1989).

El efecto de los bacteriófagos sobre la flora ruminal, principalmente en el metabolismo funcional, ha sido poco documentada y, en vista de la alta densidad bacteriana que existe en el rumen, la presencia de estos virus es un hecho demostrado (Lickington *et al.*, 1988; Swain *et al.*, 1996). Se han reportado cantidades de  $3.0 \times 10^9$  a  $1.6 \times 10^{10}$  de partículas virales por mililitro de líquido ruminal; sin embargo, Reyrolle *et al.* (1982) y Klieve y Swain (1993) consignan que la cantidad de fagos dependerá de la metodología de aislamiento y que la mayor cantidad de partículas virales se ha obtenido con la técnica de ultracentrifugación.

Una de las funciones importantes de los bacteriófagos es la liberación de nutrientes del protoplasma celular y, como resultado de ello, se reduce la eficiencia (menor tasa de degradación) en la utilización de los nutrientes (Swain *et al.*, 1996), ya que eventualmente causan la lisis celular (Firkins *et al.*, 1992; Teuber y Lembke, 1983). Swain *et al.* (1996) consignan que la población de bacteriófagos en el rumen es única de cada animal, ya que no existe intercambio entre los animales, como ocurre con la flora y la fauna. Esta dinámica individual en la población viral da como resultado variaciones en su cantidad; por ejemplo, es baja cerca del momento de su alimentación, alta entre las ocho y las diez horas posteriores a su alimentación, y estable durante el resto del ciclo, lo cual influye sobre este flujo de partículas virales. Según los especialistas, lo anterior está relacionado con el tipo de alimentación, ya que algunos ingredientes de la dieta fomentan su aumento debido a un cambio en la temperatura del rumen, lo cual induce la fase lí-

tica. Otra teoría indica que el cambio en la concentración de bacterias, tal como un aumento en la flora hospedadora de bacteriófagos, hace que ocurra una infección lítica. Klieve *et al.* (1989) anotan que la frecuencia de aislamiento de fagos desde bacterias ruminales no es común, sugiriendo que los fagos observados en el contenido ruminal podrían ser originados por una asociación lisogénica o pseudolisogénica entre los virus y las bacterias que habitan ahí. Algunos resultados indican que de un total de 38 cepas, sólo 27% presentó partículas virales, lo cual significa que solamente 20% de las bacterias ruminales producen o se encuentran asociadas a bacteriófagos lisogénicos.

### Métodos de aislamiento de fagos

Se han utilizado diversos medios de cultivo para el crecimiento y aislamiento de bacteriófagos en BAL; los principales son: el M17, más 0.5% de lactosa a 30 °C (Moineau *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 1999); el Elliker, con 1% de extracto de carne (a 43 °C, Sheehan *et al.*, 1999); y 2.5 µg mL<sup>-1</sup> de clo-ranfenicol, que para su conservación a -80 °C se adiciona 10% de glicerol.

Para las pruebas de sensibilidad y presencia de fagos (técnica de la doble capa) (Figura 2) se ha utilizado el agar Bacto (1.5% y 0.75% de agar para cada placa) Kadary *et al.*, 2000; Saturio y Klaenhammer, 2002), el medio MRS, adicionando CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10 mM (Aquad *et al.* 1997; Carminati *et al.*, 1997; Ley de Coss y Cobos, 2006 datos no publicados), y el medio a base de tripticasa peptona y extracto de levadura (Cotta y Whitehead, 1993). Lapointe *et al.* (1996) reportaron que las BAL y sus fagos fueron evaluados en medio de agar M17, más 0.05% de lactosa; adicionado con CaCl<sub>2</sub> 1 mM e incu-

bados durante 16 h a 21 °C; después fueron filtrados y se conservaron a 4 °C y, usando la técnica de la doble placa (3 mL de medio de cultivo M17; placa blanda 0.5% de agar), se adicionó un mL de leche más 200 µL de la suspensión de fago aislados (10<sup>9</sup> UFP mL<sup>-1</sup>) y 0.1 mL de *Lactobacillus lactis*; incubando durante 24 h a 30 °C.

El medio M17, suplementado con 0.5% de glucosa (M17G), fue utilizado para cultivar *Lactococcus lactis* e incubados a 30 °C; también los virus fueron conservados en el medio M17G con 20% de glicerol (Garbut *et al.*, 1997) y el mismo medio M17 fue utilizado por Maija-Liisa *et al.* (1986), pero suplementado con Ca<sup>2+</sup>, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (10 mM) y omisión de citrato de calcio y carboximetil celulosa. El proceso de aislamiento usado fue suero de leche como inóculo de partículas virales (centrifugado a 3000 x g durante 20 min y posterior filtrado —0.45 µm de diámetro de poro—). Todo este proceso se hizo a 20 °C y las cepas fueron conservadas a -20 °C en medio agar y 4 °C en medio líquido con 40% de glicerol. Por otra parte, Caso *et al.* (1994) cultivaron BAL y sus respectivos bacteriófagos fueron propagados en medio MRS más Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 10 mM y MgSO<sub>4</sub>; 10 mM incubados a 37 °C y conservadas con 50% de glicerol a -50 °C. Bacterias como *Streptococcus mutans* y *Bacillus coagulans* crecieron a 37 °C en un medio triptona de soya más 0.7% de extracto de levadura, mientras que *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus paracasei* fueron crecidos a 37 °C en un medio MRS (Sheehan *et al.*, 1999).

La bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium* fue crecida en un medio de infusión de cerebro-corazón (BHI) más 500 g<sup>-1</sup> de cisterna mL<sup>-1</sup> y 10 µg<sup>-1</sup> de hemin mL<sup>-1</sup> bajo anae-

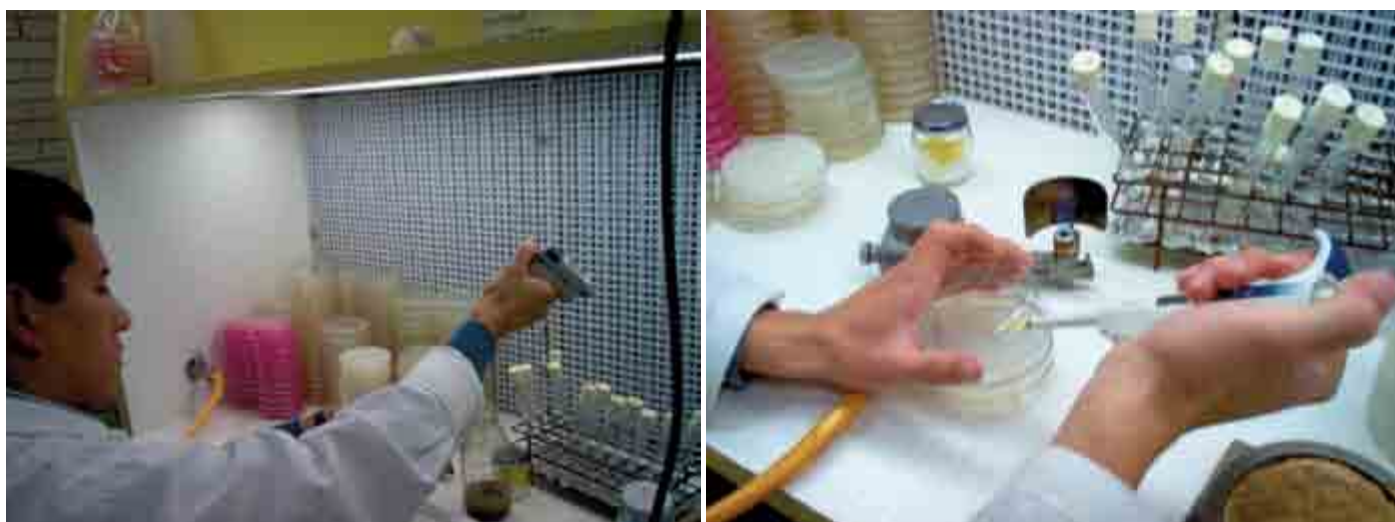


Figura 2. A: Siembra de cultivo puro de bacteria ruminal. B: Técnica de doble placa para determinar la existencia y la actividad lítica de los fagos.

robiosis en cajas de petri y mediante la técnica del tubo rolado de Hungate. La dilución de fagos fue conservada en una solución con  $\text{MgSO}_4$  (10 mM) Tris (-20 mM, pH 7.4) y para la técnica de evaluación se utilizó la doble capa con incubaciones durante toda la noche (Lockington *et al.*, 1988). En la mayoría de las investigaciones donde se ha utilizado la técnica de doble placa para determinar la existencia y actividad lítica de los fagos, se hacen tres diluciones consecutivas en el sembrado de las placas.

Las técnicas para la detección y el fármaco inductor de la fase lítica (Cuadro 1) han registrado diferencias en cuanto a la cantidad de organismos reportados (Auad *et al.*, 1997; Shirley *et al.*, 1998) e indican que las dosis de antibióticos empleadas para la inducción de la lisis oscilan entre 0.05 y  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de mitomicina C, ya que a mayores concentraciones producen la muerte de la cepa bacteriana (Klieve *et al.*, 1989). De igual forma, Reyrolle *et al.* (1982) reportaron la liberación de

partículas virales en BAL después de que éstas fueron sometidas a una inducción por radiación UV, por mitomicina C ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), registrando otras de forma espontánea.

La técnica con mitomicina consiste en que 10 mL de medio de cultivo inoculado con el 2% de la cepa de interés (densidad óptica [DO]=0.05) se incubaba durante 90 min a  $30^\circ\text{C}$  hasta una DO de 0.1; se adiciona mitomicina y es incubado por 3 h a  $30^\circ\text{C}$ . Posteriormente, los tubos se centrifugan a

Cuadro 1. Resultados de la inducción y el aislamiento de bacteriófagos.

BACTERIA	FAGO	CONCENTRACIÓN (UFP $\text{mL}^{-1}$ )	MEDIO DE CULTIVO	CONDICIÓN	ACTIVADOR FASE LÍTICA	PURIFICACIÓN Y MEDIO CONSERVADOR	FUENTE
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	NI	$4 \times 10^5$ a $4.6 \times 10^3$	MRS	6 h a $37$ y $42^\circ\text{C}$	0.05 a $0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de mitomicina C	Centrifugación ( $1200 \times g$ ) $\times 10$ min a $24^\circ\text{C}$ y el sobrenadante filtrado ( $0.2 \mu\text{m}$ $\phi$ poro)	Auad <i>et al.</i> (1997)
<i>Lactococcus lactis</i>	NI	NR (Concentración de partículas virales)	M17+glucosa	NR	$2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de eritromicina + $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de mitomicina C		Shirley <i>et al.</i> , (1998)
Bacterias ruminales	NI	NR	A base de líquido ruminal (FR)	Incubados 24 h a $38 \pm 0.05^\circ\text{C}$	$2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de mitomicina C	Centrifugado y en 100 $\mu\text{L}$ de una solución salina de Hungate	Klieve <i>et al.</i> (1989)
Bacterias ruminales	NI	NR	A base de glucosa, celobiosa, almidón + FR	Incubados 24 h a $38 \pm 0.05^\circ\text{C}$	$2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de mitomicina C	En el mismo medio de cultivo	Ley de Coss y Cobos, 2006, datos no publicados
BAL iniciadoras	NI	NR	Suero de leche	Incubados 24 h a $38 \pm 0.05^\circ\text{C}$	$2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de mitomicina C	Suero centrifugado y filtrado ( $0.45 \mu\text{m}$ poro).	Maija-Liisa <i>et al.</i> (1986)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	$\theta\text{LP}_2$ y $\theta\text{LP}_1$	NR	Buffer SM con $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RNAasa	Ultracentrifugación a 35000 rpm durante 2 h	$2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de mitomicina C,	El medio fue la sol. conservada a $4^\circ\text{C}$	Caso <i>et al.</i> (1994),
<i>Selenomonas ruminantium</i> (cepa M-7),	NI	NR		Ultracentrifugaron a 35000 rpm durante 16 h	$1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de mitomicina C,	medios fueron conservados a $4^\circ\text{C}$	Lockington <i>et al.</i> (1988)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	NI	NR	$\text{CaCO}_3$ , buffer maleato y 30 mL de suero.	Centrifugo a $8000 \times g$ durante 30 min y filtración ( $0.45 \mu\text{m}$ ).	$0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de mitomicina C	Placas de cultivo MRS- $\text{Ca}^{2+}$ agar y suspendidos sol de 0.5 M de NaCl.	Séchaud <i>et al.</i> (1992)

NI: NO IDENTIFICADO; NR: NO REPORTADO.

4000 xg durante 10 min y el sobrenadante se filtra (0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro).

Caso *et al.* (1994) utilizó una técnica adaptada, utilizando mitomicina más ultracentrifugación para concentrar los fagos en un pellet, el cual fue suspendido en solución conservadora, concluyendo que la mayoría de los fagos aislados necesitan la inducción química, aun estando dentro de la misma bacteriana. Teuber y Lembke (1983) reportan que la situación de los bacteriófagos en BAL mesófilas es que un alto porcentaje de estos virus se encuentran en un estado lisogénico y, mediante la inducción por irradiación de UV o mitomicina C, solamente una de cada tres partículas virales son liberadas. Se ha registrado además que solamente de 3.2% a 12.7% del sobrenadante de cultivos tratados con mitomicina inhiben el crecimiento de otras cepas de la misma especie (Caso *et al.*, 1994), lo cual explica la especificidad de los fagos sobre sus hospederos (Aquad *et al.*, 1997). Lapointe *et al.* (1996) reportan que después de 10 horas de infección, la población de *Lactococcus lactis* se redujo de  $1.8 \times 10^9$  a  $3.7 \times 10^3$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , mientras que la cantidad de virus se incrementó de  $10^{10}$  UFP  $\text{mL}^{-1}$  a las 2 horas después de la inoculación y, posteriormente, la población declinó gradualmente y se estabilizó alrededor de  $10^7$  UFP  $\text{mL}^{-1}$ .

Klieve *et al.* (1989) reportan que de 30 cepas de bacterias ruminales aisladas solamente en *Eubacterium ruminantium* (AR2 y AR35), *S. bovis* (AR3), *S. intermedius* (AR36), *Bacteroides ruminicola* sub. *brevis* (AR29, AR30 y AR32) y *Butyrivibrio fibrisolvens* (AR14), se reportó presencia de partículas virales mediante la inducción con mitomicina C, mientras que AR35 de *Eubacterium ruminantium* produjo fagos sin inducción. Así también, reportan fagos aislados de las bacterias *Ruminococcus flavefaciens* (AR71 y AR72) y de un bacilo con características celulolíticas identificada como *R. flavefaciens* cepa AR66, ambas inducidas con mitomicina C. Un punto importante a recalcar es que existe cierto gusto por nutrientes específicos ya que, de acuerdo con Klieve *et al.* (1989), el bacilo celulolítico AR66 y *S. intermedius* (AR36) solamente produjeron fagos cuando crecieron en medios de cultivo M10 y no cuando lo hicieron en uno con líquido ruminal, mientras que *R. flavefaciens* (AR71 y AR72) produjo fagos cuando creció en medios con líquido ruminal, pero no en M10. Por otra parte, *E. ruminantium* (AR35) produjo mayor concentración de fagos no completos o partículas virales en un medio con líquido ruminal y los tallos fueron completos cuando crecieron en medios M10. Reyrolle *et al.* (1982) reportan que 43% (49 de 113 cepas) fueron lisogénicas inducidas con mitomicina ( $1 \mu\text{m}$   $\text{mL}^{-1}$ ); además de las 113 cepas, 25% de éstas fueron lisadas por lo menos

por algún fago atemperado aislado, lo que significa que existe especificidad, ya que fagos aislados de una cepa no siempre lisan a otra, y el grado de susceptibilidad está dado por el grupo de clasificación o tipo o grupos de bacterias. Existen algunos que tienen un 100% de sensibilidad o por lo menos muy alto (cinco cepas de siete contra 13 fagos), e indican que los fagos espontáneos varían ampliamente entre cepas, ya que sus concentraciones fueron desde 10 UFP en 49% de las cepas evaluadas, hasta concentraciones de  $1 \times 10^6$  UFP  $\text{mL}^{-1}$  en 3.8% de las cepas, lo que representa solamente 2% de los casos. Sin embargo, cuando existe la inducción con mitomicina C, las cantidades son de  $6.8 \times 10^8$  UFP  $\text{mL}^{-1}$ , aunque 25.6% de las cepas producen la inducción espontánea, con un número de hasta  $1 \times 10^6$  UFP  $\text{mL}^{-1}$ .

### Tipos de bacteriófagos

Muchos fagos han sido aislados de BAL y, en su mayoría, corresponden a la familia Siphoviridae (tipo B), la cual se caracteriza por la existencia de fagos virulentos y DNA bicatenario de alrededor de  $35 \pm 3.0$  kpb sin extremos cohesivos (Caso *et al.*, 1994; Saturio y Klaenhammer, 2002). Klieve *et al.* (1989) reportaron fagos B con dimensiones de cabezas de 55 a 60 nm, tallos de 150 a 160 nm de longitud con 60 nm de diámetro o 110 nm de longitud y 10 a 12 nm de diámetro, con collar y placa basal, mientras en *S. bovis* se han encontrado fagos tipo B, aunque las partículas víricas no se encontraron intactas. Maija-Liisa *et al.* (1986) reportaron 10 tipos de fagos B en las cepas *S. cremoris*, *S. lactis* Subs. *diacetylactis* y *Leuconostoc cremoris*; dentro de este grupo de virus aislados, lo único que se diferenciaba era el tamaño y la presencia o ausencia del collar, placa basal y la presencia o ausencia de fibras en la cola. Estas características fundamentan que hay subdivisiones de fagos dentro de un mismo grupo. Durante un periodo largo de aislamiento de diferentes muestras de suero, 80% pertenece al grupo B, el cual se subdivide en B2 y B3 dentro de la clasificación de Ackermann y Eisenstark (1974), citado por Maija-Liisa *et al.* (1986).

En *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* se reporta un fago tipo A (de tallo contráctil y cabeza poliédrica) atemperado. El fago aislado ( $3.0 \times 10^6$  UFP  $\text{mL}^{-1}$ ) tuvo la capacidad de infectar también a las subespecies *bulgaricus* spp. (Aquad *et al.*, 1997); también uno del tipo A fue aislado en *S. ruminantium* (Lockington *et al.*, 1988). En tanto, Séchaud *et al.* (1992) reportaron que los fagos de *Lactobacillus helveticus* tienen una cabeza isométrica (50 nm de diámetro) con cola rígida y envoltura contráctil, perteneciente al tipo A (taxonómica Bradley's) o a la familia Myoviridae (del comité internacional de taxonomía de virus); en general, 100% de los fagos

pertenecen al tipo A, dentro de dos grupos morfológicos de tallo corto y tallo largo.

### Otros métodos de aislamiento de bacteriófagos

Klieve *et al.* (1989) registran trabajos con electroforesis en geles de campo pulsante y densitometría láser para determinar el número de fagos mediante la comparación de parámetros en las bandas de ADN. Con esta técnica reportaron diferentes concentraciones de fagos entre animales alimentados en los mismos corrales, recibiendo el mismo alimento, resultando cantidades de ADN viral de 0.69, 3.87, 2.00 y 1.98  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de líquido ruminal en los días 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Otra técnica adicional reportada para el aislamiento de fagos es el uso de naranja de acridina y la exposición a luz UV (UV-C 190-290 nm), la cual es absorbida por los ácidos nucleicos, inactivando los virus. Carminati *et al.* (1997) evaluaron pruebas de microfiltración con tamaño de poro de 0.025  $\mu\text{m}$ , así como pruebas de ultracentrifugación a 100,000 xg durante 20 min a 4 °C, evaluando con la técnica de doble placa.

## CONCLUSIONES

Se han identificado partículas virales en los trabajos de aislamiento e identificación de fagos en la industria ganadera, tanto de productos lácteos como de bacterias ruminales; por tanto, es indispensable evaluar el potencial de estos microorganismos para controlar o inhibir el crecimiento de bacterias dañinas en la producción. Tal es el caso de *S. bovis* en las engordas de rumiantes; sin embargo, en la industria lechera se busca un efecto contrario, es decir, evitar el daño de estos virus bacteriófagos a las BAL. Diferentes medios y condiciones de cultivo han permitido obtener cantidades y tipos distintos de fagos; por ello, es necesario seguir con el estudio de estos microorganismos para que puedan usarse como herramienta en la mejora de sistemas intensivos de producción con rumiantes.

## LITERATURA CITADA

- Auad L., de Ruiz-Holgado A.A.P., Forsman P., Alatosava T., Raya R.R. 1997. Isolation and Characterization of a New *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* Temperate Bacteriophage. *J. Dairy Sci.* 80:2706-2712.
- Brussow H., Fremont M., Bruttin A., Sidoti J., Constable A., Fryder V. 1994. Detection and Classification of *Streptococcus thermophilus* Bacteriophages Isolated from Industrial Milk Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4537-4543.
- Bruttin A., Desiere F., d'Amico N., Guerin J.P., Sidoti J., Huni D., Lucchini S., Brussow H. 1997. Molecular ecology of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage infection in a cheese factory. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3144-3150.
- Carminati D., Mazzucotelli L., Giraffa G., Neviani E. 1997. Incidence of Inducible Bacteriophage in *Lactobacillus helveticus* Strain Isolated from Natural Whey Starter Cultures. *J. Dairy Sci.* 80:1505-1511.
- Caso J.L., de los Reyes-Gavilán C.G., Herrero M., Montilla A., Rodríguez A., Suarez, J.E. 1994. Isolation and Characterization of Temperate and Virulent Bacteriophage of *Lactobacillus plantarum*. *J. Dairy Sci.* 78:741-750.
- Cotta M.A., Whitehead T.R. 1993. Regulation and Cloning of the Gene Encoding Amylase Activity of the Ruminal Bacterium *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:189-196.
- Favrin S.J., Jassim S.A., Griffiths M. 2001. Development and Optimization of a Novel Immunomagnetic Separation Bacteriophage Assay for Detection of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Broth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:217-224.
- Firkins J.L., Weiss W.P., Piwonka E.J. 1992. Quantification of intraruminal recycling of microbial nitrogen using nitrogen. *J. Anim. Sci.* 70:3223.
- Garbutt K.C., Kraus J., Geller B.L. 1997. Bacteriophage Resistance in *Lactococcus lactis* Engineered by Replacement of a Gene for a Bacteriophage Receptor. *J. Dairy Sci.* 80:1512-1519.
- Joklik W.K. 1997. Naturaleza, aislamiento y cuantificación de virus animales. In: Joklik, W. K., Willet, H. P., Amos, D. B., y Wilfert, C. M. (Eds).



Figuras 3. Cultivo en técnica de tubo rolando e inducción de la fase lítica en bacterias ruminales con antibióticos alcaloidales azirídnicos aislados de *Streptomyces caespitosus* (mitomicina C).

- Microbiología de Zinsser. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 997-1042.
- Kadary D.R., Shaffer J.J., Lott S.E., Wolf T.A., Bolton C.E., Gallimore W.H., Martin E.L., Nickerson K.W., Kokjohn T.A. 2000. Influence of Infected Cell Growth State on Bacteriophage Reactivation Levels. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5206-5212.
- Klieve A.V., Swain R.A. 1993. Estimation of Ruminant Bacteriophage Numbers by Pulsed Field Gel Electrophoresis and Laser Densitometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2299-2303.
- Klieve A.V., Hudman J.F., Bauchop T. 1989. Inducible Bacteriophages from Ruminant Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1630-1634.
- Lapointe M., Champagne C.P., Vuilleumard J.C., Lacroix C. 1996. Effect of Dilution Rate on Bacteriophage Development in an Immobilized Cell System Used for Continuous Inoculation of Lactococci in Milk. *J. Dairy Sci.* 79:767-774.
- Lockington R. A., Attwood G.T., Brooker J.D. 1988. Isolation and Characterization of a Temperate Bacteriophage from the Ruminant Anaerobe *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1575-1580.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Nutrición y metabolismo. In Brock, Biología de los microorganismos. 10a Edición. Ed. Pearson, Prentice Hall, España. pp. 109-148.
- Maija-Liisa, Nurmiäho-Liisa, S.E., Meriläinen V.T., Forsen R.I. 1986. Ultrastructure and Host Specificity of Bacteriophage of *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis* subsp. *Diacetylactis*, and *Leuconostoc cremoris* from Finnish Fermented Milk "Viili". *Appl. Environ. Microbiol.* 52:771-777.
- Moineau S., Bernier D., Jobin M., Hébert J., Klaenhammer T.R., Pandian S. 1996. Production of Monoclonal Antibodies against the Major Capsid Protein of the *Lactococcus* Bacteriophage  $\lambda$ 36 and Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Direct Phage Detection in Whey and Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2034-2040.
- Reyrolle J., Chopin M.C., Letellier F., Novel G. 1982. Lyso-genic Strains of Lactic Acid Streptococci and Lytic Spectra of Their Temperate Bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:349-356.
- Séchaud L., Cluzel P.J., Rousseau M., Baumgartner A., Accolas J.P. 1988. Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie.* 70:401-410.
- Séchaud L., Rousseau M., Fayard B., Callegari M.L., Quénee P., Accolas J.P. 1992. Comparative Study of 35 Bacteriophages of *Lactobacillus helveticus*: Morphology and Host Range. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1011-1018.
- Sheehan M.M., Stanley E., Fitzgerald G.F., van Sinderen D. 1999. Identification and Characterization of a Lysis Module Present in a Large Proportion of Bacteriophage Infecting *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:569-577.
- Shirley A.W., Dombroski C.S., Klaenhammer T.R. 1998. Common Elements Regulating Gene Expression in Temperate and Lytic Bacteriophages of *Lactococcus* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1147-1152.
- Sturino J.M., Klaenhammer, T.R. 2002. Expression of Antisense RNA Targeted against *Streptococcus thermophilus* Bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:588-596.
- Swain R.A., Nolan J.V., Klieve A. 1996. Natural Variability and Diurnal Fluctuations within the Bacteriophage Population of the Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:994-997.
- Teuber M., Lembke J. 1983. The bacteriophage of lactic acid bacteria with emphasis on genetic aspect of group N lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek.* 49:283-295.
- Vasala A., Valkkila M., Caldentey J., Alatossava T. 1995. Genetic and biochemical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* bacteriophage LL-H lysin. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4004-4011.

