

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDI DE LISOGÈNIA DE LEUCONOSTOC OENOS I INCIDÈNCIA DELS BACTERIÒFAGS SOBRE LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA DEL VI
Montserrat Poblet Icart
DL:T-1578-2009 / ISBN: 978-84-692-4539-2



**ESTUDI DE LA LISOGÈNIA DE *LEUCONOSTOC OENOS* I
INCIDÈNCIA DELS BACTERIÒFAGS SOBRE LA
FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA DEL VI.**

Memòria presentada per
MONTSERRAT POBLET ICART
per optar al grau de Doctora en Ciències Químiques

Tarragona, Setembre de 1994



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Dr. Albert Bordons
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA
Facultat de Química
Pça. Imperial Tarraco, 1
43005-Tarragona.
Tel. 977 559567
Fax 977 559597

El sotasignant, Dr. Albert Bordons de Porrata-Doria, Professor Titular del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona,

FA CONSTAR

que el present treball, amb títol "Estudi de la lisogènia de *Leuconostoc oenos* i incidència dels bacteriòfags sobre la fermentació malolàctica del vi", que presenta na **MONTSERRAT POBLET ICART**, per optar al Grau de Doctora en Ciències Químiques, ha estat realitzat sota la codirecció d'ell mateix i de la Dra. Aline Lonvaud-Funel, de l'Institut d'Enologia de la Universitat de Bordeus II, i que tots els resultats obtinguts són fruit dels experiments realitzats per l'esmentada doctoranda.

I perquè se'n prengui coneixement i tingui els efectes que correspongui, signa aquesta certificació.

signat: Albert Bordons

Tarragona, 5 de setembre de 1994

La present tesi doctoral ha estat realitzada a l'Institut d'Enologie de Bordeus, dins el marc del programa ECLAIR amb el suport de la Comunitat Europea. L'obtenció d'aquesta beca ha fet possible la realització d'aquest treball.

Je remercie Madame Aline Lonvaud, Professeur à l' Université de Bordeaux II, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire où j'ai fait mes premiers pas dans la recherche et d'avoir bien voulu diriger cette thèse. Grâce à sa confiance et motivation au long de cet travail, son aboutissement a été possible. Je lui exprime ici ma sincère gratitude.

Agraeixo al Dr. Albert Bordons, professor de l'Universitat Rovira i Virgili de Tarragona, l'ajut i suport que m'ha donat en tot moment perque aquest treball fos possible. Com a director de la tesi i des de l'inici sempre ha estat amatent a qualsevol consulta i correcció.

Expresso la meva més sincera gratitud als professors que han tingut l'amabilitat d'examinar aquesta memòria:

Dr. Joan Jofre

Dr. Josep Sancho

Dra. Isabel Pardo

Dra. Josepa Salvadó

Dr. Fernando Zamora

Els agraeixo la seva presència en aquest tribunal.

Je tiens spécialement à remercier mes camarades de laboratoire qui ont participé de près au bon déroulement de cet travail. Une pensée particulière pour Annick, Muriel et Sandrine, je ne oublierai jamais les bons moments passés ensemble. Leur amitié, leurs conseils et leur rires ont été essentiels pour surpasser des moments quelquefois très difficiles. Une pensée aussi pour Zoltan qui m'a montré l'importance de la force intérieure.

Je remercie tous mes copains de l'Institut d'Enologie et d'ailleurs pour tous les moments de joie, les mots de soutien et le bonne humeur.

A tous les membres de l'Institut d'Enologie je les remercie de leur accueil et solidarité.

Agraeixo als meus pares el suport que m'han donat en tot moment, la seva presència constant i la seva confiança m'han donat la força necessària per concloure aquest treball, sense ells res d'això no hauria estat possible. Una menció especial per a la meva mare que amb molta paciència ha fet les correccions ortogràfiques d'aquesta memòria.

ABREVIATURES

Abs	absorbància
AM	àcid màlic
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosin 5'trifosfat
BSA	albúmina bovina
Ci	curie
cpm	comptes per minut
DA	Medi Dubois + alcohol
dATP	desoxiadenosin 5'trifosfat
dCTP	desoxicitidin 5'trifosfat
dGTP	desoxiguanidin 5'trifosfat
DNA	àcid desoxiribonucleic
DNAsa	desoxiribonucleasa
dNTP	didesoxiribonucleòsid trifosfat
dTTP	desoxitimidin 5'trifosfat
dUTP	desoxiuracil 5'trifosfat
DV	Dubois + vi
EDTA	àcid etilen diamin tetraacètic
FA	fermentació alcohòlica
FML	fermentació malolàctica
<i>g</i>	gravetats
IOEB	<i>Institut d'Oenologie de Bordeaux</i>
kb	kilo bases
kv	kilovolts
MBq	megabecquerel
MC	mitomicina C
MDa	megadalton
NAD	nicotinamida adenin dinucleòtid
NTCK	còctel de desplaçament de tall
<i>L.</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
pb	parells de bases
PEG	polietilenglicol
PM	pes molecular

qsp	quantitat suficient per
RNAsa	ribonucleasa
SDS	dodecil sulfat de sodi
SSC	citrat sòdic salí
TCA	veure apartat 2.5.1
TE	"
TEB	"
TES	"
TM	"
Tris	tris hidroximetil aminometà
UFC	unitats formadores de colònies
UFP	unitats formadores de plaques o clapes
UV	ultravioleta
V	volts
Φ	Fag

INDEX

1 - INTRODUCCIÓ

1.1 - ELS BACTERIS LÀCTICS A L'ENOLOGIA	2
1.1.1 - Aproximació històrica	2
1.1.2 - Taxonomia i identificació dels bacteris làctics	3
1.1.3 - L'espècie <i>Leuconostoc oenos</i>	4
1.1.4 - Ecologia dels bacteris làctics implicats en la fermentació malolàctica	5
1.1.5 - Factors que influeixen en el desenvolupament de <i>Leuconostoc oenos</i> .	6
1.2 - FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA	8
1.2.1 - Implicacions de la fermentació malolàctica en enologia	8
1.2.2 - Mecanismes de degradació de l'àcid màlic	9
1.2.3 - Mecanismes de control de la fermentació malolàctica	11
1.3 - BIOLOGIA GENERAL DELS BACTERIÒFAGS	12
1.3.1 - Aproximació històrica	12
1.3.2 - Replicació dels bacteriòfags	14
a - Adsorció i penetració dels bacteriòfags	14
b - Característiques del cicle de multiplicació	14
c - Factors que afecten el desenvolupament dels fags	17
d - Agents que impedeixen la multiplicació dels fags	19
1.4 - BACTERIÒFAGS DELS BACTERIS LÀCTICS	20
1.4.1 - Morfologia dels bacteriòfags	20
1.4.2 - Estructura del genoma de les partícules fàgiques i dels profags	24
1.4.3 - Tècniques analítiques dels DNA dels fags	26
1.4.4 - Concepte de lisogènia	26
a - Virulència i pèrdua de la lisogènia	27
b - Incidència de la lisogènia en els bacteris làctics	27
c - Lisogènia en <i>Leuconostoc oenos</i>	28
1.4.5 - Resistència als bacteriòfags	28

1.4.6 - Presència dels bacteriòfags en les fermentacions làctiques	30
1.4.7 - Presència dels bacteriòfags durant la fermentació malolàctica	30

2 - MATERIALS I MÈTODES

2.1 - SÒQUES DE BACTÈRIS I DE BACTERIÒFAGS	34
2.1.1 - Bacteris làctics	34
2.1.2 - Bacteriòfags	37
2.2 - CULTIU I CONSERVACIÓ DELS BACTERIS	37
2.2.1 - Medi de cultiu	37
2.2.2 - Condicions de cultiu per a els bacteris	39
2.2.3 - Conservació de les soques	39
2.3 - INDUCCIÓ, CULTIU, PURIFICACIÓ I CONSERVACIÓ DELS BACTERIÒFAGS	39
2.3.1 - Inducció dels bacteriòfags amb la mitomicina C	39
2.3.2 - Sensibilitat de els bacteris a diferents concentracions de mitomicina C	40
2.3.3 - Verificació de la presència de bacteriòfags en un lisat	40
a - Observació al microscopi electrònic de transmissió	41
b - Test de la gota	41
c - Comptatge pel mètode de la doble capa	42
2.3.4 - Selecció d'una soca indicadora	42
2.3.5 - Multiplicació dels bacteriòfags	43
2.3.6 - Concentració i purificació dels bacteriòfags	43
2.3.7 - Test d'adsorció dels bacteriòfags	45
2.3.8 - Determinació de la inducció espontània de fags en els bacteris lisogènics	46
2.3.9 - Determinació de la presència de bacteriòfags en el vi	46
2.3.10 - Conservació dels bacteriòfags	46
2.4 - MÈTODES ANALÍTICS	47
2.4.1 - L'àcid màlic	47
2.5 - TÈCNiques D'ESTUDI DELS DNA DE BACTERIS I BACTERIÒFAGS	47

2.5.1 - Solucions utilitzades	47
2.5.2 - Extracció del DNA de <i>Leuconostoc oenos</i>	49
2.5.3 - Extracció de el DNA dels bacteriòfags de <i>L. oenos</i>	50
2.5.4 - Digestió del DNA per endonucleases de restricció	51
2.5.5 - Electroforesi del DNA en gel d'agarosa	51
2.5.6 - Fixació del DNA sobre un suport sòlid	52
a - Transferència i fixació a partir d'un gel d'agarosa	52
b - Fixació del DNA en solució	53
c - Fixació del DNA a partir de colònies	53
2.5.7 - Marcatge i hibridació amb sondes radioactives	54
a - Preparació d'una sonda de DNA fàgic marcat amb ³² P per la tècnica de desplaçament de tall	54
b - Càlcul de l'activitat específica de la sonda	55
c - Condicions d'hibridació amb la sonda radioactiva	56
2.5.8 - Marcatge i hibridació amb sondes no radioactives	57
a - Preparació de la sonda	57
b - Condicions d'hibridació	58
c - Revelat de la membrana	58
2.5.9 - Altres metodologies utilitzades	59

3 - RESULTATS

3.1 - INDUCCIÓ DELS BACTERIÒFAGS EN LES SOQUES LISOGÈNIQUES DE <i>LEUCONOSTOC OENOS</i>	61
3.1.1 - Inducció amb la mitomicina C de les soques de col·lecció	61
3.1.2 - Verificació de l'inductibilitat de les soques	63
3.1.3 - Influència de la concentració de mitomicina C sobre la inducció de les soques	68
3.1.4 - Determinació de l'espectre d'hoste. Selecció d'una soca indicadora	69
3.1.5 - Discussió i conclusions	73
3.2 - OPTIMITZACIÓ DE LES CONDICIONS DE MULTIPLICACIÓ DELS BACTERIÒFAGS	75
3.2.1 - Propagació dels bacteriòfags i lisi en medi líquid	75
3.2.2 - Determinació dels diferents paràmetres del cicle de multiplicació	76
3.2.3 - Influència de la concentració de Ca ²⁺ en la multiplicació	

dels bacteriòfags	79
3.2.4 - Importància de la fase de creixement de la soca hoste per la infecció fàgica	82
3.2.5 - Influència del pH en l'activitat lítica dels fags.	83
3.2.6 - Influència de la temperatura en la multiplicació dels fags	84
3.2.7 - Discussió i conclusions	85
3.3 - RESISTÈNCIA DELS BACTERIS A LA INFECCIÓ FÀGICA	87
3.3.1 - Adsorció dels bacteriòfags	87
3.3.2 - Absència d'adsorció com a mecanisme de resistència	89
3.3.3 - Tentativa de selecció d'una soca resistent	91
3.3.4 - Discussió i conclusions	92
3.4 - CARACTERITZACIÓ I COMPARACIÓ DELS FAGS DE <i>LEUCONOSTOC OENOS</i>	94
3.4.1 - Diferenciació dels bacteriòfags per a l'estudi dels perfils de restricció del seu DNA	94
3.4.2 - Determinació de la talla del DNA fàgic	98
3.4.3 - Detecció dels bacteriòfags de <i>L. oenos</i> per hibridació entre els seus DNA	101
1 - Construcció de la sonda	101
2 - Condicions d'hibridació	101
3.4.4 - Hibridació del DNA d'un fag de <i>Lactobacillus plantarum</i> amb el DNA de diferents fags de <i>L. oenos</i>	103
3.4.5 - Observació dels bacteriòfags en el microscopi electrònic	104
3.4.6 - Discussió i Conclusions	107
3.5 - IDENTIFICACIÓ DE LES SOQUES LISOGÈNIQUES DE <i>LEUCONOSTOC OENOS</i> PER HIBRIDACIÓ MOLECULAR	
3.5.1 - Detecció del DNA fàgic per hibridació molecular amb el DNA bacterià	110
a - Determinació dels límits de detecció de la sonda	110
b - Hibridació del DNA bacterià amb el DNA fàgic	112
3.5.2 - Detecció de la lisogènia sobre cel·lules senceres. Hibridació en <i>spot</i> i hibridació sobre colònia	113
3.5.3 - Hibridació del DNA d'un fag de <i>L. oenos</i> amb el DNA cromosòmic de diferents espècies de bacteris làctics.	114
3.5.4 - Tentativa de diferenciació de soques de <i>L. oenos</i> per hibridació	

en Southern del seu DNA amb el DNA fàgic	115
3.5.5 - Discussió i conclusions	118
3.6 - EFECTES DELS BACTERIÒFAGS EN ELS CULTIUS DE BACTERIS	
3.6.1 - Inducció espontània dels bacteriòfags per les sòques lisogèniques	119
3.6.2 - Efecte d'una soca lisogènica sobre una soca sensible al profag	121
3.6.3 - Discussió i conclusions	123
3.7 - MODIFICACIONS DE L'ESTAT DE LISOGÈNIA EN LES SOQUES DE <i>L. OENOS</i>	125
3.7.1 - Tèmpora de lisogenització d'una soca no lisogènica	125
3.7.2 - Discussió i conclusions	128
3.8 - RECERCA DE BACTERIÒFAGS EN EL VI DURANT LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA	129
3.8.1 - Recerca de bacteriòfags en el vi durant la fermentació malolàctica	130
a - Descripció de l'experiència	130
b - Caracterització dels fags aïllats	134
c - Caracterització dels fags pel seu DNA	135
d - Determinació de la talla dels diferents fags	137
3.8.2 - Recerca de bacteriòfags en vins en curs de fermentació malolàctica	137
3.8.3 - Inoculació del vi amb una preparació industrial de <i>Leuconostoc oenos</i>	139
3.8.4 - Aïllament de fags en vins amb problemes durant la fermentació malolàctica	142
3.8.5 - Seguiment de la presència de fags durant la vinificació en un <i>château</i> de la regió del Medoc	147
3.8.6 - Implicació dels fags en les parades de la fermentació malolàctica dels vins	153
3.8.6 - Discussió i conclusions	156
4 - CONCLUSIONS	159
5 - BIBLIOGRAFIA	162



1- INTRODUCCIÓ

1.1 - ELS BACTERIS LÀCTICS A L'ENOLOGIA

1.1.1 - Aproximació històrica

Va ser Pasteur (1866) en el seu "Études sur le vin" qui va descriure per primera vegada la presència de bacteris làctics al vi com a causants d'alteracions. En aquest moment el vi estava considerat com el resultat de la fermentació alcohòlica del most exclusivament i tota altra transformació era causa de malaltia. Müller-Thurgau (1891) i Koch (1900) van relacionar la presència de bacteris làctics al vi amb una disminució natural de l'acidesa. No va ser fins més tard quan Ferre (1922) a Borgonya i J. Ribèreau-Gayon (1936-1946) a Bordeus, van posar en evidència la importància d'aquesta desacidificació per la producció dels grans vins; van establir també els principis de la protecció dels vins contra els bacteris causants de malalties: acidificació, sulfitatge, pasteurització. A partir d'aquest moment tots els treballs realitzats per un millor coneixement de la fermentació malolàctica (FML) intentaven provar que aquesta etapa és indispensable en l'elaboració de vi negre de qualitat. La reducció d'aquesta acidesa és el resultat de la degradació de l'àcid màlic present en el vi en àcid làctic.

La fermentació malolàctica és, doncs, reconeguda com una etapa indispensable en l'elaboració de la major part de vins negres i alguns de blancs (Kunkee, 1967; Gallander, 1979; Wibowo *et al.*, 1985; Davis, 1985) i particularment important per als vins produïts en les regions fredes i temperades. Un vi que no ha fet la fermentació malolàctica abans de ser embotellat és sempre susceptible d'evolució més tard dins la botella provocant-li terbolesa a causa de la producció de gas carbònic (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1975). L'interès essencial de la FML resideix en el fet que confereix al vi una estabilitat microbiològica: el creixement dels bacteris empobreix el vi en nutrients, fent difícil el creixement d'altres microorganismes indesitjats. No obstant, aquesta fermentació considerada com a benèfica en regions fredes i temperades podria ser desastrosa en vins produïts a regions de climes càlids on presenten una baixa acidesa que podria ser font de desequilibri gustatiu i de contaminacions microbianes (Rankine, 1972).

En el procés de vinificació les diferents espècies de bacteris làctics es succeeixen; en el raïm i en el most, coincidint amb el començament de la fermentació, la flora bacteriana està

constituïda de lactobacils, *Leuconostoc* i *Pediococcus* en proporcions variables segons les condicions de maduració (Peynaud i Domercq, 1961; Sapis *et al.*, 1978). A mesura que la constitució del medi va canviant a conseqüència de la fermentació, la flora bacteriana es va reduint en nombre i varietat d'espècies. La selecció afavoreix les soques més resistents a l'alcohol i a pH baix quedant finalment només una espècie, *Leuconostoc oenos*. En els vins menys àcids la presència de pediococs i de lactobacils asseguren la fermentació malolàctica, però poden provocar alteracions en el vi.

A l'*Institut d'Œnologie* de Bordeus es van aïllar un gran nombre de soques a partir de mostos i de vins i van ser classificades per Peynaud i Domercq (1968). Es van identificar bacils i cocs homofermentatius i heterofermentatius, els quals s'han pogut trobar també en els vins de diferents països (Chalfan *et al.*, 1977; Rossi *et al.*, 1977). La fermentació màlollàctica es realitza en la quasi totalitat dels casos per *Leuconostoc oenos*, coc heterofermentatiu, identificat tant en els vins francesos com en els d'altres països (Fornachon, 1964; Rankine, 1977; Beelman *et al.*, 1977; Silver i Leighton, 1981).

El fet que els bacteris làctics contribueixin de forma important en la qualitat dels vins per la seva capacitat de realitzar la fermentació malolàctica (Lafon-Lafourcade, 1983) ha fet que en els últims anys s'impulsi la seva inoculació amb soques comercials de l'espècie *Leuconostoc oenos*.

1.1.2- Taxonomia i identificació dels bacteris làctics

Tenint en compte la classificació que fa el manual Bergey's (1986), els bacteris làctics estan incloses en dues seccions dins la divisió de procariotes gram-positius. A la secció 12 dins dels cocs gram-positius s'hi troben els gèneres *Streptococcus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus*. No tots els *Streptococcus* són considerats bacteris làctics, només un grup, els *Lactococcus* làctics, que inclou dues espècies, *Lactococcus lactis* i *Lactococcus raffinolactis*. A la secció 14, dins dels bacils regulars gram-positius no esporulats, es troba el gènere *Lactobacillus*.

La determinació de l'espècie està basada normalment en les anàlisis bioquímiques, com són la capacitat de fermentar diferents sucres o la formació d'àcid D/L làctic a partir de la glucosa, i d'anàlisis morfològiques. Al mateix temps han estat desenvolupats altres mètodes que es basen en el contingut enzimàtic del bacteri (Hontebeyrie i Gasser, 1975) o bé en el percentatge d'homologia entre el DNA cromosòmic de diferents espècies (Garvie, 1981).

Darrerament s'han posat a punt mètodes més ràpids i segurs adaptats per fer un control microbiològic de les espècies que es troben en el vi. La determinació del percentatge

d'hibridació entre dues molècules de DNA indica l'homologia existent entre elles. Els estudis de Garvie (1976) sobre diferents bacteris làctics demostra que el percentatge d'homologia entre *L. oenos* i les altres espècies no sobrepassa el 10%. La identificació dels bacteris làctics del vi per hibridació DNA/DNA ha estat optimitzada per Fremaux (1990). La utilització de sondes marcades (^{32}P) permet de diferenciar ràpidament les diferents espècies basant-se en la seva especificitat. La verificació d'aquesta tècnica ha estat demostrada per la identificació de *Leuconostoc oenos*. Les sondes preparades a partir del DNA total de *L. oenos* no hibriden mai amb el DNA d'altres espècies la qual cosa prova l'especificitat de la sonda (Lonvaud-Funel *et al.*, 1989).

Tenint en compte la via metabòlica que utilitzen per degradar els sucres, els bacteris làctics es divideixen en homo i heterofermentatius (Lafon-Lafourcade, 1983). Si utilitzen la via d'Embden-Meyerhof, amb la qual s'obté com a producte final majoritari l'àcid làctic, els bacteris són homofermentatius; si al contrari realitzen la fermentació per la via de Warburg-Dickens obtenint com a producte final àcid làctic, CO_2 , àcid acètic, glicerol i acetaldehid, els bacteris són heterofermentatius.

Altres caràcters són igualment utilitzats per a la identificació de les diferents espècies: morfologia, tinció gram, activitat catalasa, producció d'àcid làctic a partir de glucosa i el tipus d'enantiomer obtingut (D(-), L(+), DL), creixement sobre diferents sucres, poliols i àcids orgànics (Beelman *et al.*,1977 i Chaflan *et al.*,1977).

Per fer una identificació ràpida del perfil bioquímic de les diferents espècies s'utilitzen les galeries API TEST 50CH (Lafon-Lafourcade i Joyeux, 1979; Davis *et al.*, 1985). El gènere *Leuconostoc* es distingeix per tenir un perfil d'utilització de sucres molt simplificat (Cavin, 1988).

1.1.3 - L'espècie *Leuconostoc oenos*

Les característiques del gènere *Leuconostoc* i els primers estudis sobre la seva filogènia van ser descrites per Garvie (1976 i 1981), utilitzant tècniques d'hibridació DNA/DNA i DNA/RNA va classificar les sis espècies de bacteris del gènere *Leuconostoc* en dos grups, aïllant *L. oenos*, l'única espècie acidòfila, de les cinc altres espècies (*L. mesenteroides*, *L. paramesenteroides*, *L. lactis*, *L. dextransicum* i *L. cremoris*) i agrupa filogenèticament dos lactobacils (*Lb. confusus* i *Lb. viridescens*) amb els leuconostocs.

Posteriorment, Yang i Woese (1989) per l'anàlisi de seqüències de RNAr 16S lliguen la branca dels leuconostoc a un sub-grup dels lactobacils (*Lb. halotolerans*, *Lb. kandleri*, *Lb. minor* i *Lb. viridescens*). Dins els leuconostocs, *L. oenos* és l'espècie més allunyada i els autors interpreten aquesta posició filogenètica com el resultat d'una evolució

ràpida d'aquesta espècie respecte de les altres. Schillinger *et al.* (1989) van arribar a les mateixes conclusions en quant a l'evolució de l'espècie. Per aquests autors, *L. oenos* és el segon exemple conegut, junt amb els micoplasmes, d'organisme d'evolució ràpida. Les característiques fenotípiques són atípiques tenint en compte les soques amb les quals estan lligades. Són cocs associats en parells o en cadenetes. Aquestes poden ser curtes, entre 5-8 bacteris, o bé llargues de 20 o més. Són gram-positives, immòbils, catalasa-negatives, no tenen citocroms i per tant són anaeròbiques facultatives, no esporulen, i són quimioorganotròfics, amb la qual cosa necessiten de medis de cultiu rics en factors de creixement i en aminoàcids, així com la presència d'un sucre fermentable.

L. oenos és l'espècie que creix més lentament. No obstant això, el seu caràcter acidòfil li permet de créixer en un medi hostil com és el vi, essent l'espècie que s'hi troba més sovint. Es tracta d'un coc heterofermentatiu aeròbic facultatiu. El seu pH òptim de creixement està entre 4,2 i 4,8 i el seu creixement és afavorit per la presència d'un precursor vitamínic derivat de l'àcid pantotènic, anomenat TJF (factor del suc de tomaquet) perquè és troba al tomaquet i altres fruits (Amachi *et al.*, 1971). Sembla també que les condicions reductores li són favorables (Bergey's, 1986). Utilitza l'energia dels sucres residuals: les hexoses (glucosa i fructosa), però sobretot les pentoses (arabinosa i xilosa) presents en quantitats suficients després de la fermentació alcohòlica per assegurar un creixement fins a 10^7 cel/ml en plena fermentació malolàctica (Wibowo *et al.*, 1985). Quan el desenvolupament de *L. oenos* es produeix abans que tots els sucres siguin degradats pels llevats, l'excés d'àcid D-làctic i sobretot d'àcid acètic formats poden alterar el vi produint la picadura làctica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975).

L. oenos utilitza alguns aminoàcids del vi els quals no pot sintetitzar (valina, riboflavina, tiamina, biotina, ac. fòlic...) (Peynaud *et al.*, 1965; Weiller i Radler, 1972). Els diferents àcids orgànics presents en el vi poden ser igualment metabolitzats, l'àcid cítric porta a la formació d'acetats, de lactat i de substàncies acetoïniques (Lonvaud-Funel, 1975) i l'àcid pirúvic és convertit a acetoïna i diacètil durant la FML (Van Vuren i Dicks, 1993).

1.1.4 - Ecologia dels bacteris làctics implicats en la fermentació malolàctica.

Només un nombre limitat d'espècies de bacteris són capaces de desenvolupar-se en els mostos i en els vins. Es tracta de bacteries làctics Gram (+) o de bacteris acètics Gram (-) D'entre els bacteris làctics només hi ha tres gèneres que estan relacionats amb la fermentació malolàctica: *Pediococcus*, *Lactobacillus* i *Leuconostoc* (Peynaud i Domercq, 1968; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975).

A la Taula 1.1 es relacionen les espècies que es poden trobar en els diferents moments de la vinificació. L'origen d'aquests bacteris es troba en el raïm (Peynaud, 1961), en les fulles (Radler, 1972), en el terra dels cellers i en la fusta de les botes (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1975). Durant el curs de la vinificació es produeix una evolució de diferents espècies (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983 ; Lonvaud-Funel *et al.*, 1991). Així doncs, en els mostos podem trobar com a principals espècies: *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc oenos*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus brevis*. La població màxima en aquesta primera fase de multiplicació arriba fins a 10^4 cel/ml. Durant la fermentació alcohòlica els bacteris quasi desapareixen arribant a una població de 10^2 cel/ml. La duració d'aquesta fase de latència és variable i depèn sobretot de la intervenció de factors limitants com el SO₂, la temperatura i l'aparició de bacteriòfags. Després d'aquesta fase de latència comença una segona fase de multiplicació en la qual el nombre de bacteris arriba a 10^6 cel/ml en la majoria de casos i permet començar la fermentació malolàctica.

Taula 1.1: Bacteris làctics del vi segons la seva morfologia i tipus de metabolisme (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1976).

Cocs	Homofermentatives	<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
	Heterofermentatives	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Leuconostoc oenos</i>
Bacils	Homofermentatives	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i>
	Heterofermentatives	<i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Lactobacillus brevis</i>

Una selecció natural d'espècies comença seguidament deguda a les condicions hostils que és donen en el vi (pH baix i grau alcohòlic elevat). Això fa que durant aquesta segona fase de creixement bacterià trobem quasi exclusivament l'espècie *Leuconostoc oenos* en els vins més àcids, considerada com a responsable de la degradació de l'àcid màlic (Peynaud i Domercq, 1961; Fornachon, 1964; Carre, 1982), en els vins que l'acidesa és més baixa, els pediococs i lactobacils poden assegurar la fermentació malolàctica (Costello *et al.*, 1983; Sancho i Ballesteros, 1989)

1.1.5 - Factors que influeixen en el desenvolupament de *Leuconostoc oenos* al vi.

Diferents elements coneguts des de fa molt temps incideixen en el desenvolupament dels bacteris làctics del vi. Es tracta del grau alcohòlic, la temperatura, el pH i l'SO₂, (Kunkee 1967; Ribèreau-Gayon *et al*, 1975). Altres substàncies també relacionades amb la composició del vi hi poden intervenir igualment tals com els aminoàcids, vitamines i inhibidors.

L'acidesa del vi és un dels factors preponderants. Peynaud (1967) va definir l'existència de pH limitants tant per a la multiplicació dels bacteris com per al metabolisme de diferents substrats, com l'àcid màlic o els sucres. Quan més baix és el pH el temps de latència abans que comenci la fermentació malolàctica és més llarg, el creixement bacterià és més feble i la FML durq més temp (Bousbouras i Kunkee, 1971). El pH limitant per al creixement dels bacteris làctics en el vi és de l'ordre de 2,9 a 3,0 i intervé en la selecció de bacteris en els mostos i en el vi, els lactobacils i els pediococs no resisteixen pH inferiors a 3.5 (Wibowo *et al.*, 1985). El genere *Leuconostoc* resisteix bé en els vins a pH baixos, contrariament als *Lactobacillus* i als *Pediococcus*.

El pH també pot augmentar o disminuir l'eficàcia del SO₂, regulant l'equilibri de les seves formes lliures i combinades. L'efecte antibacterià del SO₂ en forma lliure o combinada és ben coneguda, concentracions en SO₂ lliure de 1 a 10 mg/ml, o de SO₂ combinat (als compostos carconats del vi) de 50 a 100 mg/l són suficients per inhibirel creixement dels bacteris làctics (Lafon-Lafourcade i Peynaud,1974, Somers i Wescombe, 1982).

La temperatura és un element essencial perquè s'iniciï la fermentació malolàctica (Lafon-Lafourcade, 1980). Les temperatures òptimes de la FML en vinificació estan entre 20-25°C mentre que l'òptima de creixement de *L. œnos* en medi de cultiu està entre 30-33°C (Kelly *et al*, 1989).

L'etanol és un inhibidor del creixement bacterià i per tant afecta la viabilitat de les cèl.lules així com l'activitat malolàctica (Lafon-Lafourcade, 1975). La tolerància a l'etanol està lligada a la temperatura i al pH (Castino *et al.*, 1975), disminuint a temperatures elevades i a pH baixos. Per Ribèreau-Gayon *et al.*,1976,el creixement bacterià és retardat quan el percentatge d'alcohol és de 10-11%. Per a *L. œnos* el creixement és activat fins a 6% d'etanol (King i Beelman, 1986) i l'activitat malolàctica dels bacteris sencers és estimulat fins a un 10% (Lonvaud-Funel,1986) degut segurament a una fluidificació de la membrana causada per la presència d'etanol, tot facilitant així el metabolisme cel.lular.

Altres factors que no són ni físics ni químics poden afectar també el desenvolupament bacterià, com són les relacions amb altres microorganismes.

En els mostos en fermentació existeix un antagonisme entre els llevats i els bacteris, que provoquen una disminució de la població bacteriana. Això és degut al ràpid metabolisme dels llevats que empobreix el medi en sucres i aminoàcids i a la producció de molècules inhibidores per als bacteris, algunes de les quals són àcids grassos, l'àcid decanoic (C 10) i sobretot àcid dodecanoic (C 12), els quals són alliberats al vi durant la fermentació alcohòlica i tenen un fort poder d'inhibició del creixement bacterià així com de l'activitat malolàctica essent especialment actius sobre *L. oenos* (Desens, 1989).

La presència de bacteriòfags pot ser una altra causa de problemes per al desenvolupament de la flora làctica. Sozzi *et al.* (1982) van establir per primera vegada una correlació entre l'existència de fags de *L. oenos* en el vi i la dificultat que es produeixi la fermentació malolàctica. Donat que aquest punt està relacionat amb el tema principal d'aquesta tesi, és veurà amb més detall més endavant.

1.2 - FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA

1.2.1 - Implicacions de la fermentació malolàctica en enologia

Contràriament al que es creia en un principi, la presència de bacteris làctics en el vi no comporta exclusivament efectes indesitjables. El paper benèfic de la fermentació malolàctica als vins negres, els quals, en la majoria dels casos tenen un pH entre 3,0 i 4,0 i en alguns de blancs (vins d'acidesa molt elevada, com els de Borgonya i de Xampanya) és ben reconeguda. Per això a les regions vitícoles fredes aquesta fermentació és particularment necessària degut a l'acidesa dels seus vins. Es tracta, doncs, d'un dels principals medis de reducció de l'acidesa del vi per un procés biològic, contràriament als processos químics i físics que es poden utilitzar quan la FML no es fa possible (degut moltes vegades a les baixes temperatures dels cellers).

Els efectes pràctics de la FML als vins han estat durant els últims anys objecte de controvèrsia. En principi sembla difícil dir si aquesta fermentació és convenient o no per a la qualitat final del vi; però el que sí podem dir és que produeix una modificació, i així serà bo o dolent segons la finalitat esperada per l'enoleg.

Tres són els arguments que reforcen el desig que es produeixi la FML: la desacidificació dels vins, la contribució a la complexitat aromàtica i l'estabilitat microbiana.

La modificació de les característiques organolèptiques no és encara ben coneguda. Els treballs de J. Ribèreau-Gayon i E. Peynaud (1960) confirmen la freqüència d'aquesta fermentació en els vins negres de Bordeus i constaten l'efecte benèfic que proporciona als grans vins. El primer treball que relaciona les característiques organolèptiques amb la FML va ser feta a Bordeus i es va veure que aquesta desacidificació dona maduresa i complexitat aromàtica al vi (Carre, 1982). La suavitat, la perda d'agresivitat del vi i del seu caràcter verd caracteritzen, a nivell sensorial, aquesta transformació de l'àcid màlic, diàcid, a àcid làctic amb un únic grup àcid.

L'àcid làctic és el principal producte final de la FML però hi ha la formació d'altres productes que poden donar característiques sensorials diferents, com l'acetoïna i el diacetil, els quals augmenten durant la FML (Fornachon *et al.*, 1965 i Kunkee *et al.*, 1965) i que poden donar complexitat aromàtica, però que poden desaparèixer més tard a conseqüència de la remetabolització. La variació de les característiques sensorials del vi després de la FML no estan encara ben clares. Els treballs fets per Kunkee *et al.* (1964) i Webb (1962) demostren que la FML no les afecta significativament. Les petites diferències observades provenen de la utilització de diferents soques de bacteris làctics (Pilone i Kunkee; 1965).

La degradació de l'àcid màlic en el vi no comença fins que el nombre de bacteris làctics arriba a un valor de 10^6 cel/ml (Costello *et al.*, 1983) suggerint que l'enzim malolàctic està reprimat al començament de la fase de creixement (Wibowo *et al.*, 1985).

La desaparició de l'àcid màlic confereix estabilitat de cara a l'acció d'altres bacteris làctics que poden utilitzar, en absència d'altres sucres, aquest substrat energètic per al seu desenvolupament. Per altra banda és ben cert que hi ha raons per desitjar la FML i que aquesta es faci abans d'embotellar el vi, ja que en cas contrari es produirien sediments dins l'ampolla i aparició de CO_2 ; per tant podem dir que la FML dona estabilitat prevenint modificacions tardanes del vi una vegada embotellat.

1.2.2 - Mecanismes de degradació de l'àcid màlic

La degradació de l'àcid màlic en àcid làctic en enologia es coneix com fermentació malolàctica (FML) la qual dona com a resultat una reducció de l'acidesa. *L. oenos*, igual que la majoria de bacteris làctics que es troben en vinificació posseeixen l'enzim malolàctic donant-li la capacitat de descarboxilar l'àcid L(-) màlic en àcid L(+) làctic en presència de NAD^+ i de Mn^{2+} (cofactors essencials en la reacció) (Lonvaud-Funel i Strasser de Saad, 1982; 1983; Spettoli *et al.*, 1984). Koch (1900) va establir la relació entre el creixement dels bacteris làctics i la reducció de l'acidesa dels vins, considerada com a efecte benèfic per la qualitat sensorial.

L'equació per aquesta fermentació és ben coneguda des de fa molt temps. Seifert (1901) va proposar:



D'aquí ve el terme fermentació, però aquesta reacció, de fet, no és una veritable fermentació, sinó que és més aviat una reacció enzimàtica realitzada pels bacteris després del seu creixement (Lonvaud-Funel i Strasser de Saad, 1982). No obstant el terme de fermentació malolàctica es continua utilitzant en el món científic de l'enologia, per analogia amb la fermentació alcohòlica.

La transformació de l'àcid L-màlic en àcid L-làctic es va descriure per primera vegada per Korkes i Ochoa (1950) en *Lactobacillus arabinosus*. Aquesta reacció es pot donar per dues vies diferents, l'una, basada en l'acció de la malat deshidrogenasa (MDH) i l'altra en l'acció de l'enzim màlic. Els dos casos impliquen la formació d'àcid pirúvic i la intervenció de la lactat deshidrogenasa. Bréchet *et al* van establir (1966) que en el vi l'àcid L-làctic es forma en quantitat equimolecular a l'àcid L-màlic desaparegut. La formació de petites quantitats d'àcid D-làctic és deguda al catabolisme dels sucres residuals. Més tard es va veure que durant la fermentació malolàctica hi havia una transformació estequiometrica de l'àcid L-màlic a àcid L-làctic sense la intervenció de la LDH ni la formació d'intermediaris, com el piruvat, la qual cosa implicava l'existència d'un enzim que fes la transformació directa (Peynaud, 1968).

Radler *et al*, (1970) van provar l'existència d'aquest enzim que transformava directament l'àcid màlic en àcid làctic. L'enzim fou anomenat enzim malolàctic (Ribereau-Gayon *et al.*, 1975). Kunke (1974) va trobar dues rutes per a la transformació malolàctica en *Leuconostoc oenos*. La principal activitat és la de l'enzim malolàctic després es produeix una activitat secundària que representa un 2% realitzada per l'enzim màlic.

En els estudis fets sobre soques aïllades dels vins s'ha vist que aquest sistema enzimàtic està induït per l'àcid màlic (Flesh i Holbach, 1965) que depen de la presència d'un sucre fermentable. Per a alguns bacteris són les condicions de cultiu les que determinen la inducció de cada un dels dos enzims, els quals poden coexistir conjuntament en els extractes bacterians.

L'enzim malolàctic va ser purificat per primera vegada per Schütz i Radler (1974) en *Lactobacillus plantarum* i més tard en *L. oenos* (Spettoli *et al.*, 1984). Les seves característiques cinètiques i pes molecular són diferents de l'enzim màlic. Es tracta d'un complex enzimàtic format per dues subunitats idèntiques. El pes molecular és de 235.000 i el seu punt isoelèctric es troba a pH 4,35 (Lonvaud-Funel i Strasser de Saad, 1981).

El paper de la fermentació malolàctica en el metabolisme dels bacteris no està ben clar. Segons Kunkee, es tractara d'una reacció que no dona energia ni poder reductor a la cèl.lula (Kunkee, 1967). La quantitat de biomassa obtinguda de *L. mesenteroides* quan es

cultiva en un medi amb glucosa no es veu afectada per l'acció de l'àcid màlic (Kandler *et al.*, 1973). Això no obstant s'ha observat que quan s'afegeix ac. màlic al medi amb una font de carboni, augmenta la taxa de creixement (Pilone i Kunkee, 1976). *L. oenos* utilitza l'àcid màlic com a substrat en certes condicions (Chauvet *et al.*, 1980). Renault *et al.* (1988) confirmà que la decarboxilació del malat estimula el creixement de *Lactococcus lactis* però solament a concentracions limitants de glucosa (<10 g/l). Al contrari, en presència d'excés de glucosa en el medi, la conversió malolàctica inhibeix el creixement.

Després, Cox i Henick-Kling (1989 i 1990) demostren la implicació de la fermentació malolàctica en la producció d'ATP en cèl.lules senceres de bacteris làctics que posseeixen l'enzim malolàctic. L'aparició de molècules d'ATP està condicionada per l'entrada de malat en la cel.lula, per la seva decarboxilació en àcid làctic, per la sortida de lactat de la cèl.lula, per la presència d'un gradient de protons i finalment per una ATPasa capaç de funcionar. En definitiva, la FML genera un gradient electroquímic a través de la membrana plasmàtica que condueix a la producció d'una molècula d'ATP per molècula de malat degradat. La quantitat real d'ATP produït és lleugerament inferior i depèn del pH extracel.lular i de la quantitat extracel.lular de lactat. Com més baix és el pH extracel.lular (<5,5) la producció d'ATP és més gran, (Henick-Kling *et al.*, 1991).

1.2.3 - Mecanismes de control de la fermentació malolàctica

La dificultat per obtenir la fermentació malolàctica és deguda, en la majoria dels casos, a una població de bacteris insuficient, per això són possibles diferents opcions. En primer lloc cal obtenir les condicions físico-químiques òptimes per afavorir el creixement dels bacteris indígenes del vi. La inducció de la FML es pot igualment realitzar aportant bacteris exògens provinents d'un vi en plena fermentació malolàctica. Aquesta aportació de bacteris es pot fer també utilitzant ferments malolàctics industrials. La inoculació dels vins consisteix en afegir una població de bacteris viables elevada per suprimir la fase de latència i de multiplicació natural quan les condicions no són favorables. Per tal que hi hagi una degradació de l'àcid màlic apreciable la biomassa ha de ser, com a mínim de 10^6 cel/ml (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983).

Per altra banda el vi ha d'estar en condicions òptimes com són una temperatura entre 10-20°C, concentracions baixes de SO₂, i el pH no pot ser superior a 3,2. L'addició d'escorces de llevats pot afavorir la inducció de la FML per la seva capacitat d'absorbir els àcids grassos tòxics pels bacteris (Paraskevopoulos, 1988). Però això no és sempre possible i moltes vegades impedeix una FML espontània conduïda per la flora indígena del vi. Per aquesta raó es va intentar substituir-la per una població massiva preparada al laboratori. El problema no es va resoldre fàcilment. Les preparacions industrials de *Leuconostoc oenos*

eren inactives després de la seva inoculació en el vi. Lafon-Lafourcade *et al.* (1983) van proposar la reactivació de la biomassa industrial abans de la seva inoculació per tal de limitar la pèrdua de viabilitat dels bacteris. La incubació es feia en suc de raïm durant 24-48h. Aquest mètode va donar bons resultats però es tracta d'un procés llarg i pesat de realitzar la qual cosa l'ha fet deixar de banda pels viticultors.

La necessitat d'una reactivació per a les preparacions de *L. oenos* va fer pensar en un altre tipus d'inoculació: la inoculació del most per *Lactobacillus plantarum*. En aquest cas, la degradació de l'àcid màlic es fa abans de la fermentació alcohòlica i després els bacteris són completament eliminats degut al fort antagonisme amb els llevats i com que es tracta d'un bacteri homofermentatiu no hi ha formació de acidesa volàtil a partir dels sucres (Prahl *et al.*, 1989). D'altra banda, actualment s'han comercialitzat preparacions liofilitzades de *L. oenos* les quals es poden inocular directament dins del vi (Viti oenos, Chr. Hansen's Laboratorium) sense necessitat de reactivació.

L'última opció és la decarboxilació de l'àcid màlic pels llevats. Algunes espècies són capaces de realitzar aquesta transformació com *Schizosaccharomyces pombe* però es presenten efectes secundaris com la producció d'olors desagradables (Mayer i Temperly, 1963). D'altra banda els progressos realitzats en enginyeria genètica han donat la possibilitat d'identificar l'enzim malolàctic i de clonar-lo dins *Saccharomyces cerevisiae*. Els últims treballs realitzats en aquest sentit han estat fets per Denayrolles *et al.*, (1993) i Ansanay *et al.* (1993), els quals han seqüenciat i clonat l'enzim dins *S. cerevisiae*. De moment l'activitat detectada és baixa però estudis posteriors podrien permetre la finalització del treball de gran interès a nivell industrial.

1.3 - BIOLOGIA GENERAL DELS BACTERIÒFAGS

1.3.1- Aproximació històrica

El descobriment de l'existència dels bacteriòfags data de principis de segle quan D'Herelle (1917) fa la seva primera comunicació. On en una curta publicació a la revista "Comptes rendus de la Societe de Biologie" descriu un agent filtrable que és capaç d'infectar i destruir el bacil de la disenteria.

Com la major part d'organismes vius, els bacteris poden ser infectats per virus anomenats en aquest cas bacteriòfags o fags (afèresi utilitzada pels anglosaxons i acceptada actualment per tota la comunitat científica). Les dimensions extremadament petites dels fags

es fan visibles exclusivament al microscopi electrònic. El treball es va facilitar molt més davant la possibilitat d'utilitzar un mètode de quantificació dels fags desenvolupat en principi per Gratia (1936) i modificat més tard per Adams (1959) el qual es basa en la capacitat d'un fag actiu de produir zones clares sobre una capa de bacteris sensibles quan aquests creixen sobre una base de cultiu sòlid. El mètode d'Adams va ser més tard modificat per Sozzi per tal de posar en evidència els fags dels bacteris làctics. Les zones clares es produeixen a causa de la infecció del bacteri pel fag. El cicle infectiu del fag acaba amb la lisi o trencament de la cèl.lula infectada la qual allibera una nova progènie de partícules fàgiques que es difonen dins la capa semisòlida d'agar per acabar infectant les cèl.lules veïnes. Al mateix temps els fags produïts infecten i lisen nous bacteris. Al mateix temps el tapís bacterià, no infectat pels fags, continua creixent donant un aspecte opac a la placa que contrasta perfectament amb les zones de lisi.

El temps de multiplicació dels fags i el temps de generació dels bacteris són sovint semblants. Els fags difonen en totes les direccions a partir del bacteri inicial infectat, però aquesta difusió és frenada pel medi semisòlid en el qual es troben. Això permet de comprendre, d'una part, la circularitat de les plaques de lisi, i d'altra el fet que al cap d'un cert temps ja no es fan més grans. La dimensió de les plaques de lisi reflexen l'eficàcia amb la qual un bacteriòfag infecta i destrueix un bacteri. Aquesta eficàcia està relacionada amb els caràcters genètics del bacteriòfag.

En un principi es van descriure els fags com a partícules virulentes que comportaven la destrucció del bacteri hoste, però no es contemplava la capacitat d'alguns fags d'integrar-se en el cromosoma bacterià en forma de profag i persistir durant generacions en el material genètic del bacteri. En aquest cas el bacteri esdevé lisogènic.

D'Herelle va observar que alguns cultius lisogènics podien alliberar fags mantenint el cultiu en forma simbiòtica de fags i bacteri hoste. Per veure si els bacteriòfags provenien del bacteri McKinley (1925) va partir d'una colònia i la va repicar sis vegades de manera que no quedessin partícules fàgiques lliures en el medi. Aleshores es va veure que es continuaven trobant fags en el medi del que provenien els bacteris. Es demostrava així que la lisogènia es podia mantenir en absència de fags lliures.

L'atac dels bacteriòfags pot alterar tots els processos fermentatius realitzats per bacteris. Concretament en la indústria làctica el problema és ben conegut des de fa molt temps principalment per la seva repercussió econòmica (Sozzi *et al.*, 1978). En les fermentacions industrials per a la producció d'estarters, els bacteriòfags són sovint els causants de la desaparició de la població bacteriana i consegüentment de pèrdues per a la indústria.

1.3.2- Replicació dels bacteriòfags

a) Adsorció i penetració dels bacteriòfags

El primer contacte entre un fag i la cèl.lula hoste implica una associació entre ells a nivell de la superfície cel.lular degut a forces electrostàtiques que produeixen un lligament no específic. Aquesta associació és seguida d'una associació específica i reversible a una estructura específica de la paret cel.lular. El nombre i tipus de receptors és molt variable. Les mol.lècules reconegudes pels fags són normalment components essencials de la superfície cel.lular. Per exemple, el fag BF-23 es lliga al mateix receptor de la vit. B₁₂, (Di Masi *et al.*, 1973).

En els bacteris làctics:

Com es veurà després, la resistència d'algunes soques de bacteris als fags ve determinada per l'existència d'un mecanisme que n'inhibeix l'adsorció dels fags. Els treballs de Sanders i Klaenhammer (1983) fets sobre el determinisme genètic de la resistència als fags en una soca de *Lactococcus lactis* resistent van demostrar que aquest mecanisme estava codificat per un plàsmid. Tots els mutants sensibles d'aquesta soca havien perdut el plàsmid. Un altre sistema similar va ser descrit per de Vos *et al* (1984) on el mecanisme de resistència és degut a la reducció de l'adsorció i ve donat per la presència d'un plàsmid. Les soques sensibles mutants no tenen el plàsmid.

S'han observat dos tipus d'adsorció per a fags dels bacteris làctics (Budde-Niekiel i Teuber, 1987): per una part existeix una gran majoria de fags que reconeixen un nombre limitat de receptors distribuïts a la superfície cel.lular, mentre que d'altres s'adhereixen de forma homogènia per tota la superfície cel.lular.

Després de l'adsorció dels fags, el DNA és injectat des de la càpside i a través de la cua a l'interior de la cèl.lula. La partícula fàgica, buida del seu àcid nucleic, queda a l'exterior de la cèl.lula. Aquest procés va ser observat sobre *Lactobacillus casei* per Watanabe *et al.* (1987).

b) Característiques del cicle de multiplicació

El cicle biològic d'un fag temperat pot ser lític o bé lisogènic. La primera etapa de multiplicació consisteix en l'adsorció a la paret de la cèl.lula hoste la qual pot adsorbir nombrosos fags al mateix temps. El DNA del fag s'injecta a l'interior del bacteri per contracció de la beina deixant la càpside a l'exterior tal com van demostrar Hershey i Chase (1952). Des d'aquest moment el fag pot multiplicar-se immediatament com un fag virulent

donant un cicle lític o bé transformant-se en profag (DNA fàgic insertat al cromosoma bacterià) i seguir un cicle lisogènic (Figura 1.1). Els bacteris que contenen un profag es coneixen per lisogènics i els fags que poden esdevenir profags es coneixen per fags temperats. En un apartat posterior es comentarà més en detall el concepte de lisogènia.

La multiplicació dels fags va ser explicada a partir dels treballs d'Ellis i Delbrück (1939) els quals van posar a punt un mètode per estudiar el creixement quantitatiu dels bacteriòfags, anomenat **creixement en esglaó** (*one-step growth*) que consisteix a infectar un cultiu de bacteris creixent en medi líquid amb un nombre de fags suficients per infectar una petita fracció de la població; després d'alguns minuts el cultiu és diluït per impedir més infeccions. Es van agafar mostres en diferents temps per ser comptades en UFP/ml (Unitats Formadores de clapes). En les condicions d'Ellis i Delbrück les UFP van ser constants durant 20 minuts a 37°C. El nombre de calbes és constant durant algun temps després de la infecció degut al fet que cada bacteri infectat produeix una sola calba independentment del nombre de fags que contingui en el moment de sembrar en placa. Aquest mètode va permetre treballar en condicions de "cicle únic" de manera que els fags produïts en el primer cicle de multiplicació no infectin nous bacteris per donar un segon cicle. Així es poden determinar realment els paràmetres d'un cicle de multiplicació en una població de bacteris.

Aquests resultats van verificar les prediccions d'Herelle (1926) en les quals determinava tres fases en el cicle de multiplicació dels fags:

- 1) Adsorció al bacteri hoste.
- 2) Multiplicació a l'interior de la cèl.lula.
- 3) Ruptura de la cèl.lula amb l'alliberament de la progènie de fags.

L'anàlisi dels resultats obtinguts per Ellis i Delbrück a partir del seu experiment de creixement en esglaó van permetre de definir una sèrie de paràmetres en la corba de creixement del fag T₄ d'*E. coli*.

El primer període de temps en que no hi ha canvis en la titulació de bacteriòfags (nombre que hi ha en un lisat), es coneix com a **període de latència** i correspon al temps d'adsorció i de multiplicació intracel.lular. El període següent és el **període d'explosió** i correspon al temps de lisi de la cèl.lula infectada on la titulació de fags augmenta considerablement. Al final d'aquest període el nombre de fags queda constant, sempre que el cultiu estigui ben diluït per evitar l'adsorció i conseqüent infecció dels fags de la segona generació.

La titulació dels fags després de la seva multiplicació, necessitava una estratègia especial per assegurar que el nombre de fags comptats correspongués al seu nombre real dins el lisat. Ellis i Delbrück (1938) van verificar que la relació entre el nombre de plaques

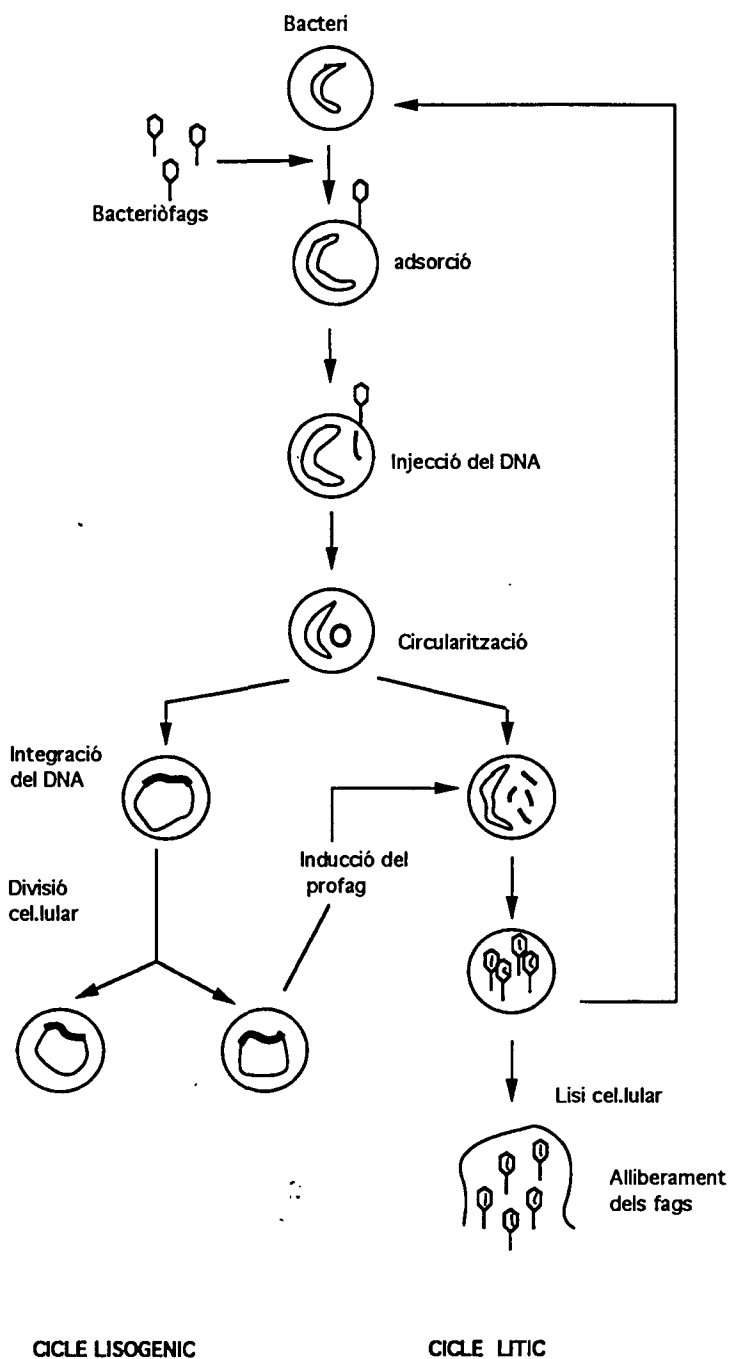


Figura 1.1: Representació esquemàtica del cicle biològic d'un fag atenuat.

de lisi i la concentració de fags en un determinat lisat, és lineal. Es dedueix d'això que una placa de lisi prové de la infecció d'un bacteri sensible per una sola partícula fàgica, és a dir, que el nombre de plaques de lisi correspon al nombre de partícules infeccioses presents en la suspensió viral. Si no fos així, i més d'una partícula vírica fos necessària per provocar la lisi del bacteri, la corba obtinguda seria una paràbola, si tenim en compte que la variable que determina el nombre de fags que infecten un bacteri segueix una distribució de Poisson. Es pot considerar aleshores que tots els fags que provenen d'una sola placa de lisi constitueixen un clon originat d'una sola partícula parental.

La proporció entre la titulació final de fags i l'original es coneix per **grandària d'explosió** i representa la mitjana de la producció de fags per cèl.lula infectada. Es considera que l'adsorció és completa (condicions ideals de treball) i que cada placa de lisi comptada durant el període de latència correspon a una cèl.lula infectada. Per saber si les condicions de treball són les adequades es pot calcular la proporció de cèl.lules no infectades en un cultiu a partir de la distribució de Poisson: $P_0 = e^{-m}$, on P_0 és la probabilitat que una cèl.lula no adsorbeixi cap bacteriòfag i m és la mitjana de fags adsorbits per cèl.lula, tenint en compte que l'estudi experimental de l'adsorció dels fags va permetre d'establir que segueix una distribució de Poisson.

D'una manera general podem dir que l'acumulació de partícules fàgiques en un cultiu segueix una cinètica aparentment exponencial al començament, i que esdevé lineal al final del cicle. L'existència d'una fase exponencial implica que els genomes dels fags produïts dins el bacteri hoste es repliquen per produir una segona generació, que es tornarà a duplicar successivament. Va ser Luria (1951) qui va demostrar per primera vegada que la multiplicació dels bacteriòfags era exponencial. El final del cicle de multiplicació del fag es produeix per la mort del bacteri hoste, resultat de la destrucció de la paret cel.lular.

Una de les variacions més importants de la tècnica de creixement en esglaó va ser descrita per Doermann (1948a). Aquesta permet seguir el desenvolupament del fag a l'interior de la cèl.lula provocant una lisis artificial abans que finalitzi la fase de latència mitjançant l'addició de cianida al medi de cultiu, la qual provoca la ruptura de les cèl.lules infectades. El comptatge dels fags presents en el lisat permet de determinar el nombre mitjà de partícules infeccioses per cèl.lula.

c). Factors que afecten el desenvolupament dels fags

El que moltes vegades es considera resistència als bacteriòfags no és altra cosa que la existència de certes condicions, que impedeixen el seu desenvolupament independentment de les característiques inherents al bacteriòfag i al bacteri hoste.

Les condicions que poden afectar el desenvolupament del bacteriòfag inclouen la temperatura, concentració iònica del medi, pH, concentració de nutrients i fase de creixement del bacteri hoste. Aquestes condicions poden ser modificades per aconseguir un medi idoni que impedeixi o afavoreixi la multiplicació; però, en tot cas, les modificacions han de ser fetes per cada cas concret per a un fag determinat i per a un hoste determinat.

Els medis de cultiu que tenen un efecte quelant per als ions divalents, són efectius inhibint el desenvolupament dels fags (Mermelstein, 1982; Pearce, 1978). A part dels requeriments específics d'ions divalents, els medis de cultiu que permeten el creixement del bacteri hoste permeten també el desenvolupament dels fags.

La fase de creixement del bacteri hoste pot afectar l'eficiència per formar plaques de lisi. En alguns casos és preferible utilitzar el bacteri hoste en fase estacionària per obtenir un màxim d'eficiència (Paeke i Stanley, 1978; Potter i Nelson, 1952). En altres casos les cèl.lules han d'estar en fase exponencial (Mullan, 1979). La fase òptima de creixement per obtenir un màxim d'eficiència no pot ser generalitzada, s'ha de determinar en cada cas concret, no obstant això, s'ha de tenir en compte que si la infecció es fa quan molts dels bacteris són morts o sense capacitat de replicació, els fags s'adsorbiran a cèl.lules que no seran capaces de permetre la seva multiplicació, disminuint l'eficiència en la formació de plaques de lisi.

Pel que fa als bacteris làctics:

El requeriment de ions divalents ha sigut determinat per alguns fags. Per als fags de streptococs, que es multipliquen en medis rics en calci, la llet i el Ca^{2+} són indispensables per la multiplicació (Collins *et al.*, 1950). Potter i Nelson, 1952) van trobar que les concentracions que permeten el desenvolupament dels fags dels bacteris làctics està entre 2 - 3 mM.

L'efecte de la temperatura va ser estudiat primerament per Hunter (1943) sobre el desenvolupament dels fags d'estreptococs. Els seus resultats indiquen que la mutiplicació del fag i el creixement del seu bacteri hoste depenen de temperatures diferents. Altres estudis mostren que l'augment de la temperatura (de 30°C a 37 o 40°C) millora considerablement el desenvolupament d'alguns fags d'estreptococs (Hull i Brooke, 1982; Klaenhammer i Sanozky, 1985; McKay i Baldwin, 1984; Sanders i Klaenhammer, 1980), en tots els casos, aquesta millora és deguda a la disminució del període de latència, increment de la grandària d'explosió o de la disminució de la capacitat d'adsorció.

Mullan *et al.* (1981) van descriure que en certs casos, les interaccions fag-hoste eren sensibles a temperatures entre 38-40°C. Sozzi *et al.* (1978) després d'analitzar 19 soques de

lactococs, va trobar solament tres soques sensibles a la temperatura, contràriament al gran nombre trobat per Mullan.

La conclusió que es pot constatar en la literatura (Hull i Brooke, 1982; Hunter, 1943; Mullan, 1981; Pearce, 1978) sobre l'efecte de la temperatura en la multiplicació dels fags, és que els valors òptim de creixement pels bacteris són molt pròxims als del desenvolupament dels fags i en definitiva, els fags es multipliquen quan els bacteris poden créixer, cosa que fa que la temperatura òptima pel creixement bacterià sigui un factor important.

d) Agents que impedeixen la multiplicació dels fags

La utilització d'agents anti-fags per controlar el seu desenvolupament lític no està encara ben determinat. Alguns productes descrits es poden utilitzar a nivell de laboratori però no encara a escala industrial. L'única excepció és el cas de la utilització de fosfats, els quals tenen un efecte quelant per als ions divalents com el Ca^{2+} i Mg^{2+} , importants per al desenvolupament (Hargrove *et al.*, 1961). Els fosfats van ser provats en una planta pilot com a experiència industrial, encara que normalment s'utilitzen en la preparació d'estarters industrials en la indústria làctica. Aquests fosfats poden ser afegits en forma de compost ràpidament soluble o com a compost que es solubilitza lentament (Hargrove *et al.*, 1961; Sandine i Ayres, 1981). No obstant existeixen fags que no requereixen la presència de Ca^{2+} per als quals aquest procediment no té cap efecte (Sozzi, 1972). Els fosfats no impedeixen l'atac dels fags durant la fermentació ja que la seva acció és a nivell de l'estarter impedit la inoculació de fags al medi de fermentació. Alguns medis de cultiu que contenen fosfats, s'han posat al mercat per la producció d'estarters, però els resultats no han sigut massa bons en quant a l'efectivitat i els costos de producció són més elevats, de manera que els industrials han preferit lluitar contra l'atac dels fags prenent més mesures d'higiene durant la fermentació (Sandine, 1977; Ledford i Speck, 1979).

L'espermina és un altre dels productes provats per impedir el desenvolupament dels bacteriòfags. Els fags de *Lactococcus lactis* no s'arriben a multiplicar fins i tot a concentracions tan baixes com $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ (Erskine, 1970). La seva acció no és a nivell de la injecció del DNA. Quan es lisen els bacteris infectats per mètodes físics o enzimàtics després de ser tractats amb espermina, aquests no alliberen cap fag intacte, és a dir, aquest compost actua impedit la síntesi del nou material fàgic. La seva utilització com a mesura de protecció dels bacteris durant la fermentació i la seva aplicació a escala industrial, no està encara ben estudiada.

1.4 - BACTERIÒFAGS DELS BACTERIS LÀCTICS

1.4.1 - Morfologia dels bacteriòfags

Els bacteriòfags dels bacteris làctics pertanyen als grups morfològics A i B de la classificació de Bradley (1967). En el grup A es troben els fags que presenten la cua contràctil, en el grup B la cua no és contràctil i llarga, entre 100-250 nm; en els dos casos les càpsides són isomètriques de 45-65 nm de diàmetre. (Taula 1.2a). Segons la classificació feta per Lwof *et al.* (1962), els fags dels bacteris làctics pertanyen a la família Mioviridae (taula 1.3). A la taula 1.2b es descriuen les característiques fàgiques de dos gèneres de bacteris.

La Figura 1.2 mostra les diferents parts que es poden diferenciar en un bacteriòfag del tipus T4, en els fags dels bacteris làctics no trobarem aquesta complexitat com veurem més endavant.

Taula 1.2a: Classificació dels bacteriòfags feta per Bradley (1967) basada en les característiques morfològiques i tipus d'àcid nucleic.

Grup	Descripció	Tipus d'àcid nucleic
A	Cua contràctil	DNA bicatenari
B	Cua llarga no contràctil	DNA bicatenari
C	Cua curta no contràctil	DNA bicatenari
D	Càpside gran i sense cua	DNA monocatenari
E	Càpside petita i sense cua	RNA monocatenari
F	Filamentós	DNA monocatenari

Taula 1.3: Classificació per famílies dels bacteriòfags proposada per Lwof, Home i Tournier (1962).

Presència d'embolcall	Tipus de material genètic	Família	Característiques
Càpside nua	ADN	F. Microviridae	Càpside isomètrica de dimensions molt petita i sense cua.
		F. Mioviridae	Càpside isomètrica o allargada i cua contractil
		F. Styloviridae	Càpside isomètrica i cua llarga no contractil
		F. Podoviridae	Càpside isomètrica i cua molt curta
		F. Tectiviridae	Càpside isomètrica amb espicules i sense cua
		F. Corticoviridae	Càpside isomètrica sense espicules i sense cua.
Càpside amb embolcall	ARN	F. Inoviridae	Filamentosos
		F. Leviviridae	Càpside isomètric i sense cua
		F. Plasmaviridae	Càpside isomètrica i sense cua
		F. Cystoviridae	Càpside isomètrica i sense cua

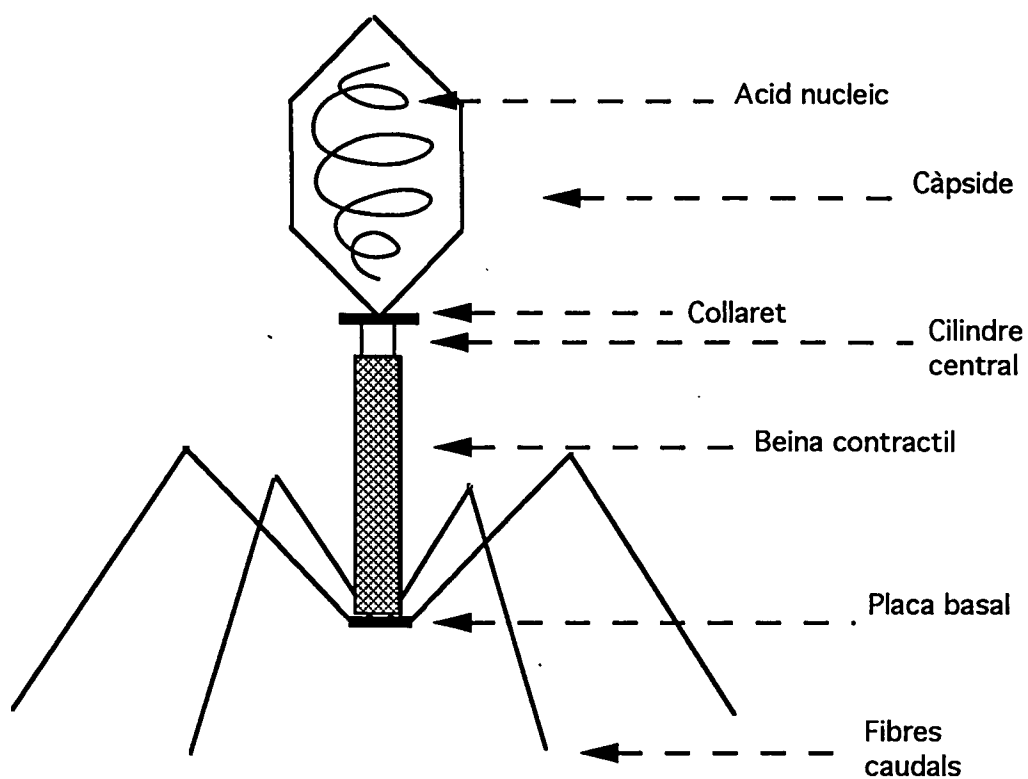


Figura 1. 2: Esquema de les diferents parts que podem diferenciar en un bacteriofag.

Taula 1.2b: Classificació morfològica i dimensions dels fags d'alguns bacteris làctics

Espècies bacterianes	Grup de BRADLEY	Dimensions (nm)			Referències Bibliogràfiques
		Llargada càpside	Llargada cua	Diàmetre cua	
<i>Leuconostoc</i>	B	45-72	210-290	6-10	Shin i Sato (1979)
		88-89	120-150	26 (beina)	Sozzi <i>et al.</i> (1982)
<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus ssp. lactis</i>	B	44-55	116-170	5-12,5	Accolas i Spillman (1979)
			200-290		
			600-700		Sozzi <i>et al.</i> (1981)

Els treballs fets sobre la morfologia dels fags dels lactobacils és relativament escassa. Algunes soques de *Lactobacillus helveticus* presenten càpsides isomètriques (49-56 nm de diàmetre) i cua contràctil (150-230 nm de llarg), característiques típiques del grup A de la classificació de Bradley (Sozzi, 1977; Accolas i Spillmann, 1979; Reinbold *et al.*, 1982). Una soca de *Lactobacillus bulgaricus* estudiada per Reinbold *et al.*, (1982) pertany al grup A a diferència del restant de soques d'aquesta mateixa espècie i de totes les soques de *Lactobacillus lactis* que presenten les característiques del grup B de Bradley (Dentan *et al.*, 1970; Sozzi, 1977; Accolas i Spillmann, 1979). Als darrers estudis sobre lactobacils fets per Séchaud *et al.*, (1992) sobre *Lactobacillus helveticus*, de 35 fags observats en microscopi electrònic tots presenten la cua contràctil i pertanyen al grup A de Bradley o bé a la família Myoviridae (descrita pel comitè de taxonomia dels virus, Taula 1.3) i es poden distingir dos grups: els de cua llarga i els de cua curta; en els dos casos la càpside és isomètrica (50-52 nm de diàmetre). Les cues contràctils de ls fags de *L. helveticus* els distingeixen dels fags d'altres espècies de lactobacils termofílics, utilitzats en la indústria làctica com *L. delbrueckii ssp lactis* i *L. delbrueckii ssp bulgaricus*. D'altra banda fags de lactobacils amb cua contràctil han estat descrits amb anterioritat en *Lactobacillus acidophilus* (De Klerk i Hugo, 1970).

Jarvis (1984) fa la diferenciació entre una sèrie de fags aïllats del formatge i multiplicats sobre soques de *Lactococcus cremoris* a partir de la qual pot fer una diferenciació en 5 grups d'acord amb les observacions fetes al microscopi electrònic basades en les dimensions de la càpside i el tamany de la cua. En tots els casos la càpside és isomètrica i la cua no contràctil. La major part dels fags de *Lactococcus* pertanyen a la

família Siphviridae amb càpsides isomètriques o allargades i cues llargues i no contràctils (Jarvis, 1988).

La diferenciació dels fags de *Lactococcus lactis* va ser feta per Braun *et al.* (1989). La diferenciació es basa en la talla de la càpside i en l'estructura i llargada de la cua i en tots els casos la càpside és isomètrica. Les diferències entre els fags virulents i els temperats es troben bàsicament en l'estructura de la cua. Entre els virulents la diversitat era més gran que entre els atemperats.

Els fags de *Leuconostoc oenos* van ser visualitzats per primera vegada per Sozzi *et al.* (1976). L'observació es va fer a partir de vins amb dificultats a la FML al microscopi electrònic després d'una coloració negativa a l'àcid fosfotúngstic 2%. Es van poder observar tres tipus morfològics diferents:

a) Fags petits de cua llarga o mitjana, no contràctil i poc o relativament flexible grup B de Bradley.

b) Fags petits englobats dins una capa de mucopolisacàrids, càpsides no visibles, grup E de Bradley.

c) Fags petits càpside allargada, cua no contràctil, relativament flexible, molt semblants al grup ML de Bradley.

Nel *et al.* (1987) descriuen els fags de *L. oenos* aïllats a partir de vins i de sucre de canya. La morfologia que van observar va ser: una càpside hexagonal i la cua flexible no contràctil, la placa basal era normalment present, atartanyent al grup B de Bradley. Per altra banda, fags que van ser aïllats a partir de vins alemanys, presentant càpsides isomètriques i només es diferencien entre ells pel diàmetre de la càpside, la llargada de la cua i la presència de placa basal (Arendt i Hammes, 1992).

1.4.2 - Estructura del genoma de les partícules fàgiques i dels profags

Els bacteriòfags dels bacteris làctics presenten un DNA lineal i de doble cadena amb extrems cohesius que li permeten la circularització *in vitro*. Estudis al microscopi electrònic han demostrat que el DNA dels fags de estreptococs és lineal i de doble cadena entre 39-46 kb, i en els extrems presenten cadena simple (Loof *et al.*, 1983); Watanabe *et al.*, (1980). En el DNA de diferents fags de lactobacils va ser mesurat per observació al microscopi electrònic després de ser digerit per enzims de restricció i la talla del genoma està als voltans de 27 MDa (Shimizu-Kadota *et al.*, 1983). Boizet *et al.*, (1992) van analitzar el genoma de 8 fags de *L. oenos*, la talla mitjana era de 31 kb i els extrems són cohesius.

El DNA d'una gran part de fags de bacteris làctics ha estat caracteritzat per l'anàlisi amb enzims de restricció. Molts d'aquests DNA presenten un nombre molt petit de llocs de

tall de reconeixement pels enzims (Powel i Davidson, 1986). Aquesta és segurament una resposta evolutiva del fag respecte del seu hoste; el bacteri té normalment enzims capaços de degradar el DNA dels fags, després de la seva injecció com a sistema de defensa propia; Alguns fags doncs, han evolucionat reduint el nombre de llocs de tall de restricció per tal d'evitar la seva degradació pel bacteri. Les característiques físiques d'alguns dels fags aïllats a partir dels bacteris làctics es resumeixen a la Taula 1.4.

Tres gens han estat localitzats en el mapa de restricció d'un dels fags de *Lactobacillus* (M. Mata, dades no publicades) són els gens que codifiquen per les dues proteïnes principals de la càpside i per una proteïna anomenada lisina, relacionada amb la lisi cel.lular del bacteri. Aquest últim ha estat clonat en *E. coli*.

Les anàlisis d'hibridació utilitzant com a sonda el DNA del fag sobre un Southern de restricció del DNA del bacteri hoste (Baldwin i McKay, 1987, Lakshimidevi *et al.*,1988; Jarvis *et al.*,1984) en *Lactococcus lactis* confirmen la hipòtesi que el DNA del fag és lineal i s'integra en un lloc de tall específic del cromosoma bacterià. Existeixen també altres llocs de tall d'integració menys favorables (Lakshimidevi, 1988; Baldwin i McKay, 1987). Existeixen també formes lineals extracromosòmiques del DNA del fag en algunes soques lisogèniques en quantitats més abundants que la forma integrada.

El treball fet per R.R. Raya *et al.* (1992) sobre el fag Φ adh de *Lactobacillus gasseri* demostra que aquest fag s'integra en el cromosoma del bacteri en un lloc de tall específic per recombinació seguint el model clàssic de Campbell's d'integració del fag λ .

Taula 1.4: Característiques físiques del DNA d'alguns dels fags aïllats a partir de bacteris làctics.

Fag	Hoste	Talla (MDa)	G/C %	Tm (°C)	Mapa restricció
PL-1	<i>Lactobacillus casei</i>	25	44	87,5	No
P008	<i>Lactococcus diacetylactis</i>	19,6	37,5	84,7	Si
FSW	<i>L. casei</i>	27	ND	ND	Si
c2t1	<i>Lc. lactis</i>	22,6	ND	ND	No
c2t1	<i>Lc. lactis</i>	23,8	ND	ND	No
643	<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i>	14,9	38	85,5	Si
LL-H	<i>L. lactis</i>	22,1	ND	ND	Si

ND = no determinat

1.4.3 - Tècniques analítiques dels DNA dels fags

A part de l'estudi morfològic per a la diferenciació dels fags, en els darrers anys s'han començat a utilitzar les tècniques de biologia molecular i l'anàlisi del DNA per a la caracterització dels fags. Els estudis d'hibridació demostren que els fags que pertanyen a diferents grups morfològics no presenten homologia en les hibridacions DNA-DNA (Coveney *et al.*, 1987; Jarvis, 1984). Aquesta tècnica és molt sensible. Entre els fags dels lactococs es van poder diferenciar set grups entre els fags virulents i dos entre els temperats (Braun *et al.*, 1989). Els fags que pertanyen al mateix grup d'homologia presenten una forta hibridació. En alguns casos excepcionals els fags virulents hibriden fortament amb els atemperats la qual cosa fa pensar en un fag ancestral comú (Lautier i Novel, 1987).

Per verificar que els grups basats en característiques morfològiques coincideixen amb una uniformitat del DNA, es va fer una anàlisi amb enzims de restricció del DNA d'una sèrie de fags. L'homologia en el DNA va confirmar que els membres de cada grup taxonòmic eren molt similars (Braun *et al.*, 1989).

La combinació de les tècniques d'anàlisi de restricció i hibridació DNA-DNA han permès un altre tipus de classificació basat en el grau d'homologia. Boizet *et al.*, (1992) van utilitzar el DNA de diferents fags com a sonda d'hibridació. Quan la senyal era forta els fags es classificaven en el mateix grup d'homologia.

Els grups morfològics no coincideixen obligatoriament amb els grups genètics (construïts a partir de l'estudi del DNA). Jarvis i Heap (1984) descriuen dos fags de morfologia molt similar però sense cap mena d'homologia en la hibridació DNA-DNA. Coveney *et al.*, (1987) van demostrar un alt nivell d'homologia (83%) entre dos fags, un que presenta collaret i un altre sense. Jarvis i Meyer (1986) van comparar tres fags amb càpside isomètrica i van trobar entre 67-94% d'homologia; aquests tres fags provenien de diferents plantes de producció de formatge, sembrats amb diferents soques cada un.

1.4.4 - Concepte de lisogènia

La interacció entre un fag i el seu bacteri hoste pot, algunes vegades, conduir a la integració del genoma viral dins el cromosoma bacteri. El DNA viral es coneix com a profag. Els fags que presenten aquest comportament es coneixen per fags temperats i el bacteri que l'integra esdevé lisogènic. El genoma d'un fag temperat conté alguns gens que indueixen a la replicació i d'altres a la lisogenització. Un dels gens implicats en aquest últim procés codifica per a la síntesi d'un repressor que inactiva l'operó necessari per la replicació. El manteniment de la lisogènia necessita la formació continua de repressor en quantitats suficients per mantenir el fag integrat i així bloquejar la replicació fàgica. Per aquesta raó els

bacteris lisogènics són immunes a la infecció pel mateix fag o un homòleg. Quan les quantitats de repressor actiu disminueixen s'inicia l'escissió del profag del cromosoma cel·lular i la posterior multiplicació. El fenomen de derrepressió es coneix com a inducció. Això es dona a baixa freqüència de forma espontània, però es pot incrementar fins a un 100% utilitzant agents inductors artificials (Lwoff *et al.*, 1951).

a). Virulència i pèrdua de la lisogènia

Els mutants de fags temperats amb la capacitat d'infectar els bacteris lisogènics parentals es coneixen com a virulents. Shimizu-Kadota *et al.* (1983) van demostrar que alguns fags virulents aïllats de la llet derivaven d'un fag temperat de *Lactobacillus casei*. Les característiques morfològiques i serotípiques eren les mateixes i solament després de l'anàlisi del DNA es va trobar un fragment d'1,3 kb en els fags virulents que no apareixia en els temperats. Aquest element transposable és possiblement el causant de la virulència.

La pèrdua de la capacitat de lisogenitzar un bacteri és un fenomen que ha estat observat per Davidson *et al.* (1990), i està associat a una petita delecció del genoma del fag. Els gens afectats possiblement codifiquen pel manteniment de la lisogènia com pot ser el repressor o una integrasa.

b). Incidència de la lisogènia en els bacteris làctics

La primera confirmació de l'aïllament de soques lisogèniques en els bacteris làctics la va donar Reiter (1949) en *Lactococcus lactis*. Més tard es va veure que una gran part de bacteris làctics són lisogènics i que poden induir fags temperats (Klerk i Hugo, 1970). La freqüència en què es troben soques lisogèniques en les diferents espècies pot ser molt ample. Kozak *et al.* (1973) van trobar solament un 8% de soques lisogèniques després d'una inducció amb radiació UV a partir de cultius de *Lactococcus lactis*. Reyrolle *et al.*, (1982) van trobar un 43%, i Huggins i Sandine (1977) un 60%. Lee (1978) va tractar alguns cultius de bacteris malolàctics amb agents mutàgens que provocaven la inducció de fags.

La inducció espontània dels fags temperats és a la pràctica el problema més important que es pot presentar. Aquests fags induïts poden infectar altres soques sensibles utilitzades com a estàrters. Reyrolle *et al.* (1982) van detectar nivells alts d'inducció espontània en el 25% de les soques provades.

La qüestió més important per la utilització de soques lisogèniques com a ferment malolàctic en fermentacions industrials, es va produir davant la possibilitat que actuessin com a font de fags virulents, tal com ha estat demostrat per Lawrence *et al.* (1976) i per

Teuber i Lembke (1983). Híbridacions entre el DNA de fags atemperats i el DNA de fags virulents mostren una gran homologia, cosa que fa pensar en un origen comú (Coveney *et al.*, 1987 i Relano *et al.*, 1987). L'homologia parcial trobada entre alguns fags atemperats i virulents pot tenir una significació en l'evolució del fag. S'ha suggerit que la recombinació de fragments de DNA pot fer part de l'evolució dels fags virulents i és probable que els fags temperats siguin una font d'aquest DNA recombinant (Jarvis i Meyer, 1986; Relano *et al.*, 1987), per tant es necessari fer un crivellatge de les diferents soques per determinar la lisogènia i evitar així problemes d'inducció de fags en les fermentacions industrials, Davidson *et al.* (1990).

c) Lisogènia en *Leuconostoc oenos*.

L'existència de lisogènia en *L. oenos* ha estat demostrada per Arendt *et al.* (1991). El 60% de 30 soques provades eren lisogèniques. Aquest alt percentatge indica que pot ser un problema que s'ha de tenir en compte en la producció de soques pures o barrejades de *L. oenos* per la fermentació malolàctica, ja que els fags virulents trobats en el vi provenen de fags atemperats. La lisogènia es va posar en evidència a partir del tractament dels bacteris amb mitomicina C. Els resultats indiquen que la inducció del profag depèn de la concentració amb MC i de la fase de creixement del cultiu bacterià. El tractament amb la MC indueix en algunes soques aïllades en vins de Borgonya l'alliberament del profag sense ser lisats immediatament, permetent així recuperar clons lliures de profag (soques curades) Cavin *et al.* (1991).

1.4.5 - Resistència als bacteriòfags

Malgrat que la major part dels processos tecnològics (principalment en la indústria del formatge) s'han desenvolupat per tal de trobar la manera de limitar les infeccions fàgiques, es fins ara, difícil de evitar-les completament. Es per això, doncs que s'han fet esforços en el sentit de seleccionar soques resistents als fags buscant-ne de naturalment resistents en la natura o bé fent una selecció de mutants.

La resistència d'un bacteri als bacteriòfags pot venir donada per:

- Impossibilitat del fag a s'adsorbir sobre el bacteri.
- resistència lligada al caràcter de lisogènia del bacteri. El repressor del seu fag impedeix l'expressió de fags idèntics o semblants al seu profag, Es el sistema de restricció/modificació.

-Presència del mecanisme d'infecció abortiva (Abi) degut al qual solsament una fracció de les cel.ules infectades permeten la multiplicació dels fags i aquesta amb un rendiment molt baix.

Galesloot *et al.* (1966) i Thomas i Lowrie (1975) van veure que repicant soques de bacteris utilitzades com a estarters en la producció de formatges, en presència de bacteriòfags se seleccionaven mutants resistents. Aquest sistema es va utilitzar després per seleccionar soques resistents per a la indústria làctica (Hull, 1978; Czulak *et al.*, 1979). No obstant, l'èxit de les soques que demostren resistència a un gran nombre de fags no és massa gran. La poca eficàcia a llarg termini en l'ús industrial ha impedit la seva consolidació com a soques resistents (Losick i Robbins, 1967). Més tard es van identificar algunes soques resistents en un nombre més petit de bacteriòfags, i aquestes van ser estudiades per a determinar el mecanisme de resistència (Daniell i Sandine, 1981).

Un primer pas en l'estudi de la resistència el van donar Sanders i Klaenhammer (1983) en posar en evidència un plàsmid de *Lactococcus lactis* que determinava l'absència d'adsorció dels fags al bacteri hoste; la capacitat d'adsorció d'un fag depèn de la composició de la paret cel.lular i les alteracions codificades pel plàsmid poden impedir-la (Olsen *et al.*, 1974). Les soques mutants sensibles havien perdut el plàsmid. En aquest sentit Sijtsma *et al.* (1988, 1990) van relacionar la presència del plàsmid pSK112 en algunes soques resistents de *Lactococcus lactis* sub. *cremoris* amb la modificació de les propietats de la paret cel.lular la qual cosa explicaria les dificultats d'adsorció dels fags sobre aquests bacteris. La estratègia en aquest cas és l'emascament dels receptors dels fags, situats sobre la paret cel.lular, pel que s'anomenen components de superfície. La presència d'aquesta capa externa va ser posada en evidència per la seva capacitat de produir l'aglutinació dels bacteris en presència de Concanavalina A.

En aquest mateix sentit Lucey *et al.* (1992) van identificar un plàsmid que codificava per dos mecanismes de resistència, inhibició de l'adsorció i l'infecció abortiva. Els bacteris que presentaven una inhibició de l'adsorció van ser rentades en una solució de 0,05 M de NaOH la qual cosa restablí la seva sensibilitat als bacteriòfags. Una anàlisi de la paret cel.lular dels bacteris que contenien el plàsmid va revelar elevats nivells de galactosa i ramnosa. Aquestes alteracions a nivell de la paret van poder ser observades també al microscopi electrònic.

La resistència als bacteriòfags es pot donar a diferents nivells. Watanabe *et al.*, (1984) van treballar amb un mutant resistent de *Lactobacillus casei* per tal de comprendre el mecanisme dels primers passos de la infecció. Aquest mutant permetia l'adsorció però no permetia la penetració del genoma fàgic dins el bacteri hoste.

Més tard es van descriure altres plàsmids en el gènere *Lactococcus*, que codificaven per diferents mecanismes de resistència com són el sistema de restricció-modificació (Chopin *et al.*, 1984; Sanders i Kaenhammer, 1981; Sanders i Klaenhammer, 1984) o bé podien interferir en el desenvolupament intracel·lular del fag disminuint la grandària d'explosió però sense afectar el nombre de cèl·lules infectades (Jarvis i Klaenhammer, 1986; Klaenhammer i Sanozky, 1985; Sing i Klaenhammer, 1986; Steenson i Klaenhammer, 1985). Els determinants genètics per la resistència als fags en el plàsmid pTR2030 de *Lactococcus lactis* van ser localitzats, clonats i determinada la seva expressió. Es tracta d'una regió de 3 kb que conté la informació necessària per a la resistència i *In vitro*; les anàlisis de delecció confirmaven aquest fet.

1.4.6 - Presència dels bacteriòfags en les fermentacions làctiques

La interacció dels bacteriòfags amb els bacteris làctics té una particular importància econòmica en la indústria alimentària. En els processos de fermentació industrial on la productivitat depèn del creixement i de l'activitat metabòlica dels bacteris, els bacteriòfags tenen l'oportunitat de multiplicar-se sense problemes, perjudicant el seu funcionament i impeding el procés de fermentació.

Els fags han estat reconeguts des de fa temps com la principal causa del retard de creixement dels lactococs que componen els ferments en la indústria làctica. El gènere *Lactococcus* ha estat ben estudiat a fi d'evitar infeccions fàgiques en la producció del formatge i el iogurt (Huggins, 1984 ;Jarvis, 1984; Sozzi, 1980). Algunes espècies de *Lactobacillus* poden també ser objecte d'atacs per bacteriòfags (Sozzi *et al.*, 1981; Watanabe *et al.*, 1970) com *Lb. acidophilus*, *Lb. salivarius*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis*, *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii* i *Lb. plantarum*.

La lluita contra els fags és doncs un dels objectius més importants de recerca fonamental pel que fa als bacteris industrials utilitzats per les fermentacions. L'eliminació completa d'aquests fags és quasi impossible donat que poden persistir en forma de profag integrat en els bacteris lisogènics actuant aquests de reserva permanent de fags, els quals poden esdevenir virulents i provocar una contaminació (Shimuzu-Kadota *et al.*, 1983).

1.4.7- Presència dels bacteriòfags durant la fermentació malolàctica

El primer grup de recerca que va posar en evidència la presència de fags en el vi va ser Sozzi *et al.* (1976). A partir d'un vi amb problemes en la fermentació malolàctica i

després d'haver-lo concentrat per ultracentrifugació es van poder observar bacteriòfags al microscopi electrònic. Més tard es va poder comprovar l'efecte biològic d'aquests fags sobre soques de *Leuconostoc oenos* utilitzades com a estàters. El creixement d'aquests bacteris es inhibí en presència de vi filtrat amb problemes de fermentació malolàctica (Sozzi *et al.*, 1982).

Per precisar l'existència i la importància dels bacteriòfags, Cazells i Gnaegi (1982) van fer un seguiment de diferents cellers de Suïssa. Es van trobar bacteriòfags en 27 vins obtinguts de 8 caves diferents, tots amb problemes de fermentació malolàctica. En tots els casos al final de la fermentació es va trobar una flora bacteriana dominada pel gènere *Pediococcus*. La desaparició progressiva de l'àcid màlic en aquests vins demostra que en tots els casos la FML espontània havia començat normalment, però havia estat bloquejada o molt ralentitzada degut a la presència dels bacteriòfags i, per tant, una quasi desaparició de les soques de *L. oenos*.

Gnaegi *et al.* (1984) van demostrar la inhibició de la FML en els vins que han estat simultàniament inoculats amb fags i amb una soca sensible de *L. oenos*. Aquests vins han de ser reinoculats amb barrejes de soques resistents al bacteriòfag.

Sozzi i Gnaegi (1984) van proposar una sèrie de mesures per reduir la probabilitat d'infecció durant la fermentació malolàctica: (1) assegurar el creixement de *L. oenos* en el vi mantenint l'alcohol, SO₂, pH, i temperatura en condicions òptimes, (2) determinar la presència de fags en el vi de manera rutinària, (3) no utilitzar constantment la mateixa soca com a ferment malolàctic o bé utilitzar una barrega de diferents soques.

Lee (1978), va induir la lisis d'un cert nombre de soques aïllades a partir de vins de França, Alemanya, Austràlia i Suïssa utilitzant la mitomicina C com agent mutagen. Entre les 48 soques provades 11 van ser lisades, 8 d'aquests lisats contenien partícules fàgiques observades al microscopi electrònic. Les soques en les quals es van poder induir els profags eren de *Lb. casei*, *Lb. hilgardii* i *L. oenos*. Dues de les soques de *L. oenos* donaven un lisat però no es va poder detectar la presència de partícules fàgiques.

A partir d'aquest moment altres equips van començar la recerca de fags. A Austràlia es van aïllar bacteriòfags de *L. oenos* a partir de vins en curs de fermentació malolàctica. Aquests fags no afecten el creixement de soques sensibles inoculades dins el vi (Davis *et al.*, 1985). A Sudàfrica Nel *et al.*, (1987) van aïllar 20 bacteriòfags de *L. oenos* a partir de vi. Algunes de les soques comercials de *L. oenos* eren sensibles a aquests fags. Heinick-Kling *et al.* (1986) van verificar la inhibició de soques comercials de *L. oenos* inoculades en un vi amb problemes de fermentació malolàctica del qual es van aïllar fags capaços de lisar les soques de bacteris comercials inoculats.

1.5 - OBJECTIUS DEL TREBALL

L'objectiu principal d'aquest treball és el d'estudiar els bacteriòfags de *Leuconostoc oenos* i els efectes que aquests poden tenir en la fermentació malolàctica del vi. Aquest objectiu es vol assolir mitjançant el coneixement del comportament dels fags respecte dels bacteris que infecte.

L'estudi comença per l'inducció dels profags en bacteris aïllats dels vins per tal d'obtenir partícules fàgiques infectives i determinar la freqüència en que la lisogènia es presenta en les poblacions indígenes d'aquesta espècie. El segon pas serà la determinació de les condicions òptimes de multiplicació per facilitar el treball de laboratori.

Aquests fags seran diferenciats entre ells utilitzant tècniques d'anàlisi del seu DNA, el qual serà també utilitzat per la construcció de sondes que ens permetin la seva detecció quan es troba en forma de profag.

La selecció de soques resistents és una de les finalitats del treball a fi de poder ser utilitzades per l'inoculació sense el risc de que la població sigui lisada pels fags virulents.

L'inoculació del vi amb ferments malolàctics és la finalitat del programa ECLAIR en el que es participa amb aquest treball per tal de determinar si poden haver efectes perjudicials quan s'utilitzen soques lisogèniques com estarters. Aquest serà un altre dels objectius del treball.

Per últim intentarem posar en evidència partícules fàgiques infectives dins dels vins en curs de fermentació malolàctica per veure si aquesta presència està relacionada amb l'aparició de dificultats perquè aquesta fermentació es produeixi.

2 - MATERIALS I MÈTODES

2.1 - SOQUES DE BACTÈRIS I BACTERIÒFAGS

2.1.1 - Bacteris làctics

La taula 2.1 mostra el conjunt de les principals soques utilitzades i llur origen.

La part més important d'aquest treball s'ha realitzat utilitzant les soques de *Leuconostoc oenos* de la col·lecció de l'*Institut d'Enologie* de Bordeus (IOEB). Les soques van ser aïllades durant les vinificacions de 1989, directament de vins que estaven realitzant la fermentació malolàctica i procedents de diferents zones vitícoles de Bordeus.

Aquestes soques, juntament amb altres, també de *Leuconostoc oenos* aïllades a Espanya, Itàlia i Portugal, van formar part d'un programa de selecció realitzat als laboratoris de la societat Christian Hansen's Laboratorium (Horsholm, Dinamarca) dins del marc d'un programa ECLAIR (AGRE 0012) de la CEE. Els criteris de selecció en el marc d'aquest programa van ser la tolerància a l'alcohol i a baixos valors de pH. En aquest programa foren seleccionades set soques de les quals 5 van ser utilitzades en aquest treball anomenades LOD (*Leuconostoc oenos* Dinamarca) per indicar que han seguit un procés de selecció, seguit d'un número d'ordre.

Les soques EFA 24 i Lo 28 foren donades directament per T. Sozzi a l'IOEB l'any 1989.

La nomenclatura de les altres soques de *L. oenos* ve donada, en primer lloc, per dues lletres que indiquen el medi de cultiu en el qual ha estat aïllada la soca (D: Dubois; DV: Dubois + vi; DA: Dubois +10% alcohol) seguit per un número d'ordre.

Han estat igualment utilitzades altres espècies de bacteris làctics en una petita part d'aquest treball. Les soques pertanyen a la col·lecció de l'IOEB que han estat aïllades de vins de diferents regions i en diferents anys. Els dos primers dígitos indiquen l'any de l'aïllament.

Les 270 soques utilitzades per la determinació dels percentatges de lisogènia en el primer punt dels resultats (3.1.1) no estan relacionades perquè la major part d'entre elles només es van utilitzar en aquest experiment.

Taula 2.1: Relació de les principals soques de bacteris làctics utilitzats en aquest treball.

Espècie	Soca	Procedència
<i>Leuconostoc oenos</i>	D3.1	Col.lecció IOEB Bordeus (França)
	D31.2	"
	D33.1	"
	D7.1	"
	DA19.4	"
	DA3.2	"
	DA30.3	"
	DA39.3	"
	DA43.5	"
	DA44.7	"
	DA7.7	"
	DV13.6	"
	DV29.2	"
	DV35.5	"
	DV36.6	"
	DV37.8	"
	DV40.4	"
	DV40.6	"
	DV42.3	"
	DV44.4	"
	DV44.9	"
	DV47.10	"
	DV49.9	"
	LOD021	Portugal
	LOD004	Rioja (Espanya)
	LOD019	Itàlia
	LOD023	Portugal
	LOD013	Bordeus (França)
EFA 24	Sozzi (1889)	
Lo 28	"	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	8607	Bordeus (França)
	8902	"
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	7701	"
	7902	"
	8510	"
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	9103	Cognac (França)
<i>Lactobacillus brevis</i>	8511	Bordeus (França)
	8907	"
<i>Lactobacillus plantarum</i>	8512	"
	8603	"
	8904	"
	9113	"
	Vinoflora	Ch. Hansen's
<i>Lactobacillus casei</i>	8606	Bordeus (França)
	9104	"

Taula 2.2: Relació de bacteriòfags de *L. oenos* obtinguts de la inducció amb mitomicina C de les soques de la col·lecció ICEB i de l'aïllament directe en el vi. Els fags aïllats del vi de les diferents experiències es descriuen en l'apartat dels resultats.

Nom	Origen
ΦD7.1	Inducció bacteris
ΦDA27.4	"
ΦDA39.3	"
ΦDV13.4	"
ΦDV29.2	"
ΦDV35.5	"
ΦDV36.6	"
ΦDV39.8	"
ΦDV40.4	"
ΦDV40.8	"
ΦDV41.1	"
ΦDV42.7	"
ΦDV43.1	"
ΦDV44.2	"
ΦDV44.4	"
ΦLOD004	"
ΦLOD013	"
ΦLOD014	"
ΦLOD015	"
ΦLOD017	"
ΦLOD019	"
ΦLOD021	"
ΦBo	Sozzi (1989), vi Bordeus
ΦF93	vi Bordeus
ΦT92.2	vi Bordeus

2.1.2 - Bacteriòfags

Els bacteriòfags que s'han utilitzat en aquest treball tenen dos orígens diferents; per una part s'han utilitzat els bacteriòfags obtinguts a partir de la inducció amb Mitomicina C de les soques de la col·lecció ICEB, i per altra part d'aïllaments fets directament de vi en curs de fermentació malolàctica originaris de diferents *Châteaux* de la regió de Bordeus. En la taula 2.2 es relacionen els fags utilitzats.

La nomenclatura dels fags ve donada pel nom del bacteri del qual ha estat induït precedida de la lletra Φ (fi). Per als fags aïllats directament del vi la nomenclatura consta d'una lletra que determina el seu origen i d'un número d'ordre precedits igualment per la lletra Φ .

Com es pot observar, en aquesta relació de fags n'hi ha alguns que s'obtenen de soques de bacteris que no han estat relacionats a la taula 2.1 perquè aquestes soques no han estat utilitzades habitualment en aquest treball i només ho foren per induir els fags esmentats.

2.2 - CULTIU I CONSERVACIÓ DELS BACTERIS

2.2.1 - Medis de cultiu

MRS

El medi de cultiu per als bacteris, utilitzat regularment en aquest treball, és MRS (de Man *et al.*, 1960) a pH 5, en el qual s'ha modificat la quantitat d'àcid DL-màlic. En el nostre cas la concentració és sempre de 4 g/l i el pH és ajustat amb NaOH 10N (Taula 2.3).

MRS sòlid

El medi sòlid es prepara afegint 20 g/l d'agar dins el medi abans de ser esterilitzat a 120 °C durant 15 minuts.

El medi de cultiu utilitzat per a la multiplicació dels fags és el mateix però suplementat, després de l'esterilització, amb 25 mM de CaCl₂ (esterilitzat mitjançant filtració sobre membrana, Millipore HAWG, 0,45µm).

MRS-top

(Adams, 1959) És MRS amb una concentració de agar del 0,7% i a un pH igualment de 5.

Taula 2.3: Composició del medi MRS a pH 5 ajustat amb NaOH 10N.

Constituents	Concentració en g/l
Bactopeptona (o bé Triptona) (DIFCO)	10
Extracte de carn (DIFCO)	8
Extracte de llevat (DIFCO)	4
K ₂ HPO ₄	2
Citrat trisòdic	2
Acetat sòdic	5
MnSO ₄ · H ₂ O	0,05
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
Tween 80	1ml
Glucosa	20
Acid DL Malic	4
aigua destilada fins a 1litre pH 5	

Dubois + vi

Aquest medi de cultiu s'ha utilitzat exclusivament com a medi d'adaptació per als bacteris que cal sembrar posteriorment en el vi. El resembratge dels bacteris en aquest medi abans de ser inoculats dins el vi afavoreix la seva supervivència. La composició del medi és de 50% Dubois i 50% de vi.

La composició del medi Dubois es descriu a la taula 2.4.

Taula 2.4: Composició del medi Dubois a pH 4,5 ajustat amb NaOH 10N

Constituents	Concentració en g/l
Extracte de llevat (DIFCO)	5
Neopeptona (DIFCO)	5
Acid DL-màlic	10
Tween 80	1 ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,05
MnSO ₄ · H ₂ O	0,02
Suc de tomaquet centrifugat a 7000 xg i durant 10 min	250 ml
aigua destilada fins 1litre pH 4,5	

2.2.2 - Condicions de cultiu per als bacteris

En medi sòlid

La sembra es fa a la superfície de la placa mitjançant perles de vidre de 5 mm de diàmetre, previament esterilitzades les quals reparteixen l'inòcul de forma homogènia. En els casos en que la recuperació de colònies no es fa necessària l'inòcul s'inclou dins del medi, quedant les colònies a l'interior. La incubació es fa a 25 °C i en condicions d'anaerobiosi (10% CO₂ + 90% N₂). Es podria incubar en condicions d'aerobiosi donat que els bacteris làctics són anaeròbics facultatius i per tant el seu creixement no està inhibit per l'O₂ però en aquest treball s'ha pogut comprovar que és molt més ràpid en atmosfera de CO₂.

En medi líquid

La sembra es realitza a partir d'un precultiu en fase exponencial de creixement inoculat a l 1 % en tubs de 10 ml de medi i incubat a 25 °C en condicions d'anaerobiosi parcial.

2.2.3 - Conservació de les soques

Quan les soques es guarden per un període inferior a un més, es conserven en medi líquid a 4 °C. La conservació a llarg termini de les soques (colecció utilitzada en aquest treball) es fa a una temperatura de -80 °C. Per això s'agafa el cultiu en fase exponencial i se li afegeix glicerol en una quantitat que representi 1/3 del volum final.

2.3 - INDUCCIÓ, CULTIU, PURIFICACIÓ I CONSERVACIÓ DELS BACTERIÒFAGS

2.3.1 - Inducció dels bacteriòfags amb mitomicina C

Una gran part dels fags utilitzats en aquest treball són atenuats i per tant és necessària la seva inducció perquè puguin actuar com a partícules infectives. Durant tot aquest treball l'agent inductiu utilitzat és l'antibiòtic Mitomicina C (MC) (Boehringer Mannheim).

Dos tubs contenint 10 ml de medi de cultiu són inoculats amb 0.1 ml d'un precultiu en fase exponencial de creixement. S'incuben a 25 °C fins que l'Abs₆₀₀ sigui de 0.2 a 0.3. Aleshores s'afegeix la MC a un dels tubs en una concentració final de 1µg/ml, l'altre tub serveix de control. Els tubs s'incuben a 25 °C durant 48h temps durant el qual es prenen 5 mesures de Absorbància. La inducció es posa en evidència quan la corba de creixement del cultiu amb MC experimenta una dràstica baixada en comparació al tub control. Aquesta baixada d'absorbància es pot veure quan han passat al voltant de 30 h d'incubació. El cultiu de bacteris en el qual hi ha hagut la baixada de l'Abs₆₀₀ degut a l'acció dels fags es coneix com a lisat.

La verificació de la presència de fags en els tubs on s'ha obtingut un lisat a partir de la inducció amb la MC es fa absolutament necessària. La MC pot actuar com a inhibidor del creixement i per tant la baixada en la corba de creixement pot ser que no sigui deguda a la inducció dels fags.

Els lisats són primerament centrifugats durant 10 min a 12000 xg i després filtrats a través d'un filtre de 0,45 µm (Millipore HAWG) per eliminar els bacteris que puguin quedar. Després són guardats a 4°C.

2.3.2 - Sensibilitat dels bacteris a diferents concentracions de mitomicina C

La mitomicina C es afegida a cultius de bacteris en fase exponencial de creixement (Abs 600 entre 0,1 - 0,3) com s'explica en l'apartat anterior, guardant al mateix temps un tub control. Les concentracions de mitomicina utilitzades estan entre 0,05 - 5 µg/ml. El creixement del cultiu és seguit mesurant l'Abs. durant 48 hores.

2.3.3 - Verificació de la presència de bacteriòfags en un lisat

La verificació de la presència de fags en un lisat es pot fer bàsicament de dues maneres. Es poden utilitzar mètodes físics com l'observació en el microscopi electrònic, o bé biològics amb els quals es podren constatar els efectes de la seva presència; en aquest darrer cas cal un bacteri sensible al bacteriòfag, factor moltes vegades limitant.

a) Observació al microscopi electrònic de transmissió

Aquesta tècnica s'ha pogut utilitzar gracies al servei de microscopia electrònica de la Universitat de Bordeus I, segons un mètode específic per als fags donat per E. Arendt (comunicació personal)

La suspensió de fags utilitzada ha estat prèviament purificada i dialitzada. La concentració esta entre 10^9 - 10^{10} UFP/ml.

La adsorció de les partícules fàgiques es realitza sobre una pel·lícula de carbó. Aquesta pel·lícula s'obté polvoritzant grafit sobre un suport de mica dins una cambra de buit. Els petits fragments de mica recoberts de carbó (2mm de costat) es col·loquen dins 100µl de la suspensió de fags durant uns 5 minuts. Quan la pel·lícula de carbó s'ha desenganxat del suport de mica, és delicadament recuperada amb una nansa de sembra i rentada durant 5 segons en aigua bidestilada estèril. Procedint de la mateixa manera, les laminetes s'inclouen dins 100 µl d'una solució d'acetat d'uranil al 2% (pes/volum) durant 5 minuts, el qual donarà una coloració negativa. Finalment es renten una altra vegada en aigua bidestilada estèril per ser després recuperades sobre una reixeta de coure de 400 square mesh i 3,05 mm de diàmetre, la qual és assecada sobre paper de filtre. Aquestes preparacions poden ser conservades durant 3 setmanes abans de ser observades al microscopi.

El microscopi utilitzat ha estat un Joel 1200 de 120 kV (Servei de microscopia electrònica, Universitat de Bordeus I, França.)

b) Test de la gota

En una placa de Petri es posen 10 ml de MRS al 10% d'agar. Es deixa a 37°C durant al menys dues hores. Per altra banda 0,5 ml d'un cultiu de bacteris (soca sensible) al final de fase exponencial de creixement (3 dies) és inoculat sobre 3,5 ml de MRS-*top* prèviament fós i mantingut a una temperatura de 47°C al bany maria, addicionat de CaCl₂ en una concentració final de 25mM. Barrejat bé, agafa un alíquota de 2 ml i es posa sobre les plaques de Petri que s'havien guardat a 37 °C, després es deixa solidificar en una superfície perfectament horitzontal, es deixen a temperatura ambient duran 6-7 hores i després ja es pot afegir el lisat.

En cada placa es poden provar 8 lisats diferents dels quals se n'afegixen 2 µl de cada un sobre la placa, s'espera que la gota estigui completament absorbida dins el medi i després ho es posen a incubar durant 2-3 dies a 25 °C en anaerobiosi. La presència de bacteriòfags es caracteritza per l'aparició de zones clares (regions de lisi o clapes de lisi) en contrast a les zones opaques ocupades pel creixement bacterià.

Aquest és un mètode qualitatiu, pel qual es pot saber només si hi ha presència o no de fags en un lisat però no la quantitat. El mètode és limitant també perquè no detecta quantitats més petites de 10^3 UFP/ml.

c) Comptatge pel mètode de la doble capa (adaptat del mètode d'Adams, 1959)

En aquest cas el mètode és quantitatiu i ens permet determinar el nombre de partícules fàgiques per ml. La preparació de les plaques és igual que en el cas anterior. Mentre incubem les plaques de Petri a 37°C es preparen les dilucions necessàries depenent de la concentració del lisat intentant que no hi hagin més de 100 plaques de lisi per cada placa de Petri.

A 0,6 ml d'un cultiu d'una soca sensible en fase exponencial de creixement se li afegixen 0,4 ml de la dilució del lisat i es barreja bé. Es deixa incubar a 25°C durant 15 minuts perquè es produeixi l'adsorció.

Després d'haver fos l'MRS-*top* es manté a 47°C dins el bany maria, després s'agafen 3,5 ml d'aquest medi i el es barregen amb 0,5 ml del medi amb els bacteris i els fags, finalment s'afegeix CaCl_2 en una concentració final de 25 mM i seguidament es pren una alíquota de 2 ml i la es posen en forma de doble capa sobre la placa de Petri. Es deixa solidificar sobre una superfície plana i després es posarà a incubar en anaerobiosi a 25°C durant 2-3 dies.

El nombre de plaques que es pot comptar, multiplicat per les dilucions efectuades, dona la quantitat de partícules fàgiques presents en 0,1 ml de la mostra provada.

2.3.4 - Selecció d'una soca indicadora.

La selecció s'ha fet entre les soques de la col·lecció de l'ICEB. Els fags utilitzats per provar la sensibilitat han estat induïts amb mitomicina C, a partir de bacteris lisogènics (mètode descrit en el punt 2.3.1), i són per tant, fags atenuats. S'ha utilitzat el test de la gota (descrit en el punt 2.3.3 b) per determinar la sensibilitat de les soques provades als diferents fags.

2.3.5 - Multiplicació dels bacteriòfags

Els bacteriòfags, per la seva condició de paràsits obligats, es multipliquen utilitzant els mecanismes genètics d'un bacteri hoste. Es per això que en la multiplicació cal tenir en compte la fisiologia de dos microorganismes diferents.

A un cultiu de 10 ml de bacteris sensibles al fag, en fase exponencial de creixement (24 h d'incubació), se li afegeix 1 ml de lisat el qual és poc concentrat en bacteriòfags en les primeres multiplicacions. El medi es suplementa de CaCl_2 en una concentració final de 25 mM i es posa a incubar a 25 °C i en anaerobiosi parcial durant dos dies. El lisat es reconeix per una baixada de la terbolesa del medi en comparació a un tub control en el qual no s'hi ha afegit el lisat.

El lisat obtingut és centrifugat a 12000 xg durant 10 min per eliminar els bacteris que han sobreviscut a l'infecció; després aquest lisat serà utilitzat per la següent infecció fins a obtenir lisats d'una forta titulació els quals es van centrifugar i en aquest cas es van filtrar sobre membrana de 0,45 µm. Aquests lisats són els que es van guardar per utilitzar en altres experiments.

Per verificar la presència de fags en el lisat es pot fer el test de la gota o bé un comptatge mitjançant el mètode de la doble capa.

2.3.6 - Concentració i purificació dels bacteriòfags (protocol derivat de la tècnica descrita per Sambrook et al., 1989)

L'obtenció de partícules fàgiques purificades després de la seva multiplicació sobre el bacteri hoste passa per diferents etapes:

- a.- Centrifugació
- b.- Filtració
- c.- Precipitació
- d.- Ultracentrifugació

amb la metodologia següent:

a.- El lisat obtingut després de la multiplicació (10^7 - 10^8 UFP/ml) dins un volum de 10 ml de MRS, és centrifugat durant 10 minuts a 7000 xg per tal d'eliminar la majoria dels bacteris i evitar la colmatació ràpida de la membrana, utilitzada per la filtració.

b.- Aquest medi centrifugat és després filtrat sobre una membrana de 0,45 µm (Millipore HAWG) per eliminar la totalitat de les bacteries. Les partícules fàgiques que es troben en suspensió es precipiten seguint el protocol següent (Yamamoto *et al.*, 1970):

A 100 ml de lisat se li afegeix la DNAsa pancreàtica a una concentració final d'1 µg/ml i es deixa incubar durant 15 minuts a temperatura ambient. Després s'afegeix NaCl fins a una concentració final d'1M.

c.- La precipitació es fa amb polietilenglicol (PEG 6000). S'afegeix el PEG sòlid al lisat en una concentració del 8% pes/volum en presència de NaCl 1M (Yamamoto *et al.*, 1970). Es dissol, mitjançant agitació lenta amb un agitador magnètic, a temperatura ambient. Posteriorment es posen els flascons dins de gel durant 1 hora o bé es poden deixar tota la nit a 4°C per permetre als bacteriòfags formar un precipitat. Es centrifuga a 17000 xg durant 30 minuts a 4°C. Eliminem el sobrenadant i es deixen escòrrer els flascons durant 5 minuts per eliminar les restes de sobrenadant; si queden algunes gotes s'eliminen amb la pipeta.

El sediment es resuspèn en 0,3 ml del tampó TM anant en compte de recuperar tot el precipitat que hagi pogut quedar adherit a les parets del flascó.

Composició del tampó TM (Maniatis, 1982):

Tris HCl	pH=7,4	50 mM
MgSO ₄		10 mM
H ₂ O destilada	qsp	1l
(esterilitzar a l'autoclau)		

Per eliminar el PEG s'afegeix cloroform en un volum igual al de la suspensió de bacteriòfags, es barreja i es separa la fase orgànica de l'aquosa centrifugant a 12000 xg durant 10 minuts. després es recuperen la fase aquosa contenint els bacteriòfags.

d.-Una vegada els fags han estat concentrats es purifiquen mitjançant ultracentrifugació en un gradient per superposició de capes de diferents concentracions de clorur de cesi durant 20 hores a 50000 xg i a 14°C (KONTRON, model Centrikon T-2000. Rotor: KONTRON TFT 7513)

La formació del gradient és esquematitzat en la figura 2.1. Els bacteriòfags es concentren en una banda la qual, vista a contrallum té un aspecte blavós. L'extracció es fa per punció del tub de centrífuga amb una xeringa, recuperant un volum de 1-2 ml.

Per eliminar el CsCl la suspensió de fags es dialitzada en 1 litre de tampó TM durant 2 hores dues vegades a temperatura ambient i després es poden guardar els bacteriòfags a 4°C.

Durant tot el procés de purificació es necessària la presència de Mg^{++} per impedir la desintegració de les partícules fàgiques.

La purificació en gradient de clorur de cesi no s'ha fet correntment ja que la purificació és suficientment bona a partir de la precipitació amb PEG; no obstant en el cas de la purificació per a l'observació al microscopi electrònic va ser necessària la ultracentrifugació per evitar completament la presència del PEG, el qual dificultaria l'observació microscòpica.

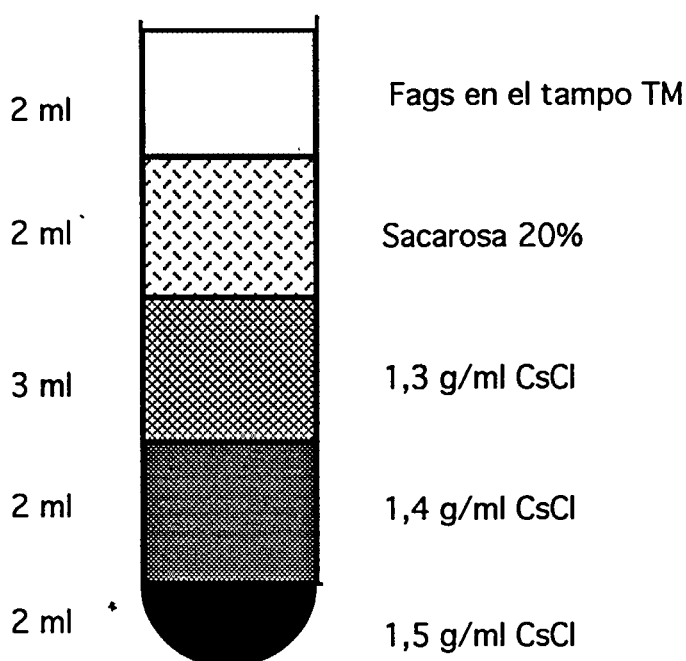


Figura 2.1: Distribució de les concentracions de CsCl en el gradient format per a la ultracentrifugació dels bacteriòfags.

2.3.7 - Test d'adsorció dels bacteriòfags

A 0,1 ml d'un cultiu de bacteris en fase exponencial de creixement (24 hores) se li afegeix 0,1 ml d'una suspensió de bacteriòfags i 2 μ l d'una solució 1M de $CaCl_2$. S'agita lleugerament, es deixa incubar a 25°C durant 15 minuts i després es dilueix amb 0,98 ml de MRS. Després de centrifugar a 12000 \times g durant 10 minuts, el sobrenadant és recuperat per fer el recompte de fags pel mètode de la doble capa (descriu en el punt 2.3.3 c).

L'adsorció s'expressa com una baixada de la titulació de fags en comparació amb una mostra control en la que només s'ha afegit la suspensió de bacteriòfags. Aquest test és una modificació del test publicat per Reyrolle *et al.* (1982).

2.3.8 - Determinació de la inducció espontània de fags en els bacteris lisogènics

10 ml d'un cultiu de bacteris lisogènics de 24 hores són centrifugats durant 10 minuts a 12000 xg i el sobrenadant filtrat sobre una membrana de 0,45 µm. Després d'haver fet les dilucions pertinents es fa un comptatge de fags pel mètode de la doble capa.

2.3.9 - Determinació de la presència de bacteriòfags en el vi

Mostres de vi obtingudes durant la fermentació malolàctica han estat analitzades per tal de determinar la presència de fags. Aquestes mostres poden ser guardades a 4°C abans de ser analitzades.

10 ml de vi són centrifugats durant 10 minuts a 12000 xg i posteriorment filtrats sobre una membrana de 0,45 µm. Després es procedeix al comptatge de bacteriòfags pel mètode de la doble capa. En aquest cas no es fa necessari fer dilucions decimals de la mostra ja que el nombre de fags que es poden trobar en el vi no és gaire elevat.

Les soques indicadores utilitzades són tres, a fi d'assegurar la detecció de la majoria dels fags presents.

2.3.10 - Conservació dels bacteriòfags

Els bacteriòfags es poden conservar de dues maneres: 1) en forma de profag o bé 2) en forma de partícula vírica.

1) Quan es conserva en forma de profag vol dir que el seu DNA es troba inclòs en el d'un bacteri per tant el que fem es conservar el bacteri com ja hem explicat anteriorment. En el moment que cal que el fag sigui infectiu s'indueix amb la Mitomicina C (o bé amb radiació UV).

2) Si es vol guardar les partícules fàgiques es fa guardant el lisat (suspensió de bacteriòfags dins del medi de cultiu obtinguda després de la lisi bacteriana) a 4 °C; en aquest cas no ho podem guardar períodes de temps superiors a un mes degut al risc de contaminació dels tubs donat que els lisats estan en medi de cultiu. En el cas que hi hagi una gran proliferació de bacteris en un lisat això pot provocar una variació en la titulació de fags degut a la seva adsorció a la superfície cel.lular.

Per guardar una col.lecció de bacteriòfags en petits volums es recupera una placa de lisi de cada un dels bacteriòfags que es volen guardar amb la nansa de sembra i s'inocula a 1 ml del tampó TM (descriu a l'apartat 2.3.5), es barreja bé, es centrifuga i es filtra sobre una membrana de 0,45 µm per eliminar tots els bacteris i després es guarden a 4°C.

Existeixen altres tampons per la conservació de bacteriòfags, però el que és important es la presència de Mg²⁺ el qual és necessari per l'estabilitat de les càpsides. En conseqüència també qualsevol tampó que es componi de EDTA sera desaconsellat per la seva capacitat d'agent quelant. En els casos en que els fags es recuperin per a una posterior extracció del DNA el tampó utilitzat haurà de tenir l'efecte contrari i per tant contindrà EDTA i el Mg²⁺ no hi serà present.

Una altra manera de guardar la col.lecció de fags en petits volums és per congelació a -20 °C. Per això barrejem el lisat amb glicerol en una proporció de 2/1. En aquest cas podem utilitzar directament el lisat sense necessitat de redissoldre els fags en un tampó.

2.4 - MÈTODES ANALITICS

2.4.1 -Àcid màlic:

La quantificació de l'àcid màlic s'ha fet per un mètode enzimàtic (utilitzant el kit Boehringer Mannheim) en el qual aquest és oxidat mitjançant la malat-DH formant NADH. El nombre de molècules de coenzim reduïdes, mesurades a 340 nm es igual al nombre de molècules de malat transformat.

2.5 - TÈCNIQUES D'ESTUDI DELS DNA DE BACTERIS I BACTERIÒFAGS

2.5.1 - Solucions utilitzades

En totes les solucions descrites a continuació s'ha utilitzat aigua destil·lada Milli Q per evitar la presència de sals (Maniatis, 1982).

Tris HCl

Tris-(hydroxymetil) aminometà 1M
ajustar a pH 7,5 amb HCl 35%

Tris-glucosa

Tris HCl pH 7,5 50 mM
Glucosa 50 mM

Tris-sacarosa

Tris HCl pH 7,5 50 mM
Sacarosa 50 mM

TE

Tris HCl 10 mM
EDTA pH 8 1 mM

TES

Tris HCl pH 7,5 100 mM
EDTA 50 mM
NaCl 800 mM

TEB

*solució concentrada (5x) per litre:

Tris borat	0,089 M	Tris base	54 g
Acid bòric	0,089 M	Acid bòric	27,5 g
EDTA	0,002 M	EDTA 0,5 M pH8	20 ml

20x SSC (Saline Sodium Citrat)

NaCl 175,3 g
Citrat trisòdic 88,2 g

qsp 1 litre

Totes les solucions anteriors són esterilitzades a l'autoclau durant 15 minuts abans de ser utilitzades a fi d'eliminar les possibles DNAses que poden contaminar l'aigua utilitzada en la seva preparació.

TE-fenol

A 250 ml de fenol se li afegeix 8-hidroxiquinoleina fins a una concentració final de 0,1%. Aquest compost de color groc és un antioxidant, inhibidor de la RNAsa i un quelant de ions metàlics. El seu color groc ens permet també d'identificar la fase orgànica de l'aquosa en les extraccions de DNA. La solució està saturada amb TE i es guarda a 4°C.

TE-RNAsa

La solució es troba a una concentració de 10 mg/ml de RNAsa dissolts en 10 mM Tris HCl (pH 7,5) + 15 mM NaCl.

TCA

Solució 100% pes/volum de TCA

TCA	500 g
H ₂ O	227 ml

2.5.2 - Extracció del DNA de *Leuconostoc oenos* (protocol derivat de la tècnica de Gasson-Davies, 1980)

La paret formada per mucopolisacàrids dels bacteris gram (+) fa difícil l'extracció del DNA. Aquesta ha d'estar perfectament degradada per assegurar una lisi completa de les cèl·lules. Si no són suficientment hidrolitzades els polisacàrids precipiten amb l'alcohol al mateix temps que el DNA i això pot donar problemes quan es fa la digestió amb endonucleases de restricció.

Protocol utilitzat per minipreparacions de DNA, es a dir, a partir de 10 ml de cultiu bacterià en fase exponencial de creixement. Abs.₆₀₀ de 0,9:

- Centrifugar durant 10 minuts a 12000 xg.
- Rentar el sediment dues vegades amb 10 ml de Tris-sacarosa
- Resuspendre el sediment en 0,9 ml de Tris-sacarosa.

- Afegir 0,1 ml d'una solució de liozima de 20 -40 mg/ml en Tris-sacarosa (2-4 mg/ml final).
- Incubar a 37°C durant 30 - 45 minuts agitant de quan en quan.
- Centrifugar durant 5 minuts a 12000 xg per l'obtenció dels protoplasts.
- Eliminar el sobrenadant i redissoldre el sediment en:

600 µl de sacarosa 25%

70 µl TES

2 µl EDTA 0,5M

100 µl de SDS 20%

Aquesta solució és utilitzada per trencar els protoplasts. Al mateix temps l'EDTA protegirà el DNA de l'acció de les nucleases.

- Incubar 30 minuts a 37°C.
- Afegir NaCl en una concentració final de 1M (1/4 del volum de la mostra) per precipitar els trossos de membrana i altres components cel.lulars.
- Remenar lleugerament i deixar-ho 1 - 2 hores dins de gel.
- Centrifugar durant 15 minuts a 12000 xg i després recuperar el sobrenadant.
- Extracció amb TE-fenol / cloroform / alcohol isoamflic (25:24:1) v/v per eliminar les proteïnes. Es barreja be i després es centrifuga durant 5 minuts per recuperar la fase aquosa.
- Extracció amb cloroform / alcohol isoamflic (24:1) v/v. Es barreja be i es centrifuga durant 5 minuts a 12000 xg per recuperar la fase aquosa.
- Precipitar el DNA amb isopropanol (0,6% del volum final) i incubar 10 minuts a temperatura ambient. Centrifugar 20 minuts a 12000 xg.
- Rentar amb 0,1 ml d'alcohol de 70% i centrifugar durant 5 minuts.
- Eliminar el sobrenadant i assecar el sediment per eliminar tot l'alcohol.
- Redissoldre en 10 µl d'aigua Milli-Q estèril i afegir la RNAsa en una concentració final de 1µg/ml.
- Deixar redissoldre el DNA durant algunes hores a 4°C i després guardar a -20°C.

Quan l'extracció es realitza a partir de 100 ml de cultiu, els volums dels reactius es multipliquen per 10. Aquest protocol es utilitzat per tal d'obtenir una quantitat important de DNA, suficientment purificat, per permetre l'acció de les endonucleases de restricció.

2.5.3 - Extracció del DNA dels bacteriòfags de *Leuconostoc oenos* (Adaptació del mètode descrit per Anderson i McKay, 1983)

Un cop els fags han estat purificats i dialitzada la preparació, es disposa de 1 ml de suspensió a partir de la qual es pot extreure el DNA.

- Afegir EDTA pH 8 en una concentració final de 20 mM i NaCl en una concentració final de 0,5 M.
- Fer una extracció amb TE-fenol/cloroform/alcohol isoamílic (25:24:1) v/v.
- Centrifugar 10 minuts a 12000 xg i recuperar la fase aquosa (fase superior).
- Precipitar el DNA amb 2 volums d'etanol absolut + 1/20 de acetat de Na 3M, i centrifugar 5 minuts a 12000 xg.
- Eliminar l'alcohol i evaporar sota la campana de buit durant 15 minuts.
- Resuspendre el DNA dins 10 µl d'aigua Milli-Q estèril i afegir la RNAsa en una quantitat final de 1 µg/µl.

2.5.4 - Digestió del DNA per endonucleases de restricció.

Els enzims de restricció són comercialitzats a concentracions de x unitats/µl essent una unitat la quantitat d'enzim necessària per hidrolitzar totalment 1 µg de DNA del bacteriòfag λ en una hora.

Tenint en compte que l'enzim està diluït en glicerol i que el volum de glicerol no pot sobrepassar el 5% dins el medi de digestió. Per digerir 1 µg de DNA en un volum final de 20 µl procedim de la manera següent:

7 µl aigua Milli-Q estèril

10 µl DNA a una concentració de 100 ng/µl

2 µl de tampó (10% del volum final). La seva composició depèn de l'enzim de restricció que s'utilitzi.

1 µl d'enzim de restricció.

Incubem a 37°C durant al menys 5 hores per a el DNA dels bacteriòfags i durant tota una nit per a el DNA cromosòmic.

El DNA es pot guardar a -20°C.

2.5.5 - Electroforesi del DNA en gel d'agarosa (Maniatis, 1982)

L'anàlisi dels fragments de restricció i dels extrems de DNA cromosòmic i fàgic ha estat realitzat prèvia migració de la mostra sobre gel d'agarosa.

Preparació del gel

L'agar es prepara al 0,8% amb TEB. 50 ml per als mini-gels i 250 ml pels grans gels. Quan l'agar està dissolt i refredat fins a 50°C s'afegeix 1 µl de bromur d'etidi d'una solució de 10 mg/ml en 50 ml d'agarosa per obtenir una concentració final de 0,2 µg/ml, es col·loca en el motlle, es deixa solidificar i després s'immergeix en la cubeta horitzontal d'electroforesi. El tampó utilitzat en l'electroforesi és igualment el TEB a una concentració de 1x. El DNA migra dins un camp elèctric continu generat per una diferència de potencial entre les extremitats del gel de 5 V/cm (100 V en 20 cm)

El volum de la mostra està entre 10-20 µl als quals afegim 1 µl de tampó de càrrega (40% sacarosa + 0,25% de blau de bromofenol). Després de la migració, el DNA és visualitzat per fluorescència del bromur d'etidi intercalat entre les bases, amb llum ultravioleta a 254 nm en un transil·luminador.

El marcador utilitzat en cada electroforesi és el DNA del fag λ digerit per l'enzim de restricció *Hind* III. El marcador ens serveix per la quantificació del DNA i per determinar la talla dels diferents fragments. El DNA de λ comprèn set fragments: 23130 pb, 9416 pb, 6557 pb, 4361 pb, 2322 pb, 564 pb.

2.5.6 - Fixació del DNA sobre un suport sòlid.

La hibridació d'un DNA amb una sonda, tant freda com radioactiva, amb finalitat analítica, requereix que aquest sigui transferit sobre un suport sòlid que pot ser, com en el nostre cas, una membrana de niló.

a) Transferència i fixació a partir d'un gel d'agarosa (mètode derivat de Southern, 1975)

Després de l'electroforesi, el gel és tractat amb 240 mM HCl durant 15 minuts per crear trencaments en el DNA i facilitar la transferència a la membrana. Després és rentat dues vegades durant 15 minuts cada una amb una solució desnaturalitzant (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl). Seguidament el gel és rentat dues vegades 15 minuts en una solució neutralitzant (1,5 M Tris-HCl pH 8, 1,5 M NaCl). Cada un dels rentats es fa en 100 ml de solució per 100 cm² de superfície de gel.

Després el gel es col·locat sobre paper Whatman 3MM del qual es deixen els seus extrems immersos dins el tampó 10 x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-citrat) per tal d'assegurar el manteniment de la força de capil·laritat, recobert per una membrana de niló carregada positivament (HybondTM-N+, Amersham) de les mateixes dimensions que el gel i sobre la qual hi posem tres capes de paper Whatman 3MM mullats dins el tampó 10 x SSC; finalment es cobreix amb una gruixuda capa de paper absorbent, premsada per un pes d'1 kg com a mínim.

La transferència s'efectua per capilaritat durant un temps de 20 hores en el cas del DNA bacterià i fàgic. El DNA és seguidament fixat a la membrana incubant amb 2 ml de 0,4N NaOH, durant 20 minuts. La membrana no ha d'estar mai recoberta per la solució ja que provocaria una barreja de les diferents bandes del DNA. El filtre és seguidament rentat en una solució 5x SSC i seguidament es pot guardar a 4°C en uns sac de plastic tancat hermeticament abans de l'hibridació.

b) Fixació del DNA en solució (DOT BLOT)

Dos microlitres d'una solució de DNA a una concentració de 50 ng/μl són desnaturalitzats per ebullició durant 10 minuts i seguidament posats sobre una membrana de niló (HybondTM-N+, Amersham) amb ajuda de la pipeta. La fixació es fa amb 0,4 N NaOH durant 20 minuts.

c) Fixació del DNA a partir de colònies

Amb aquesta tècnica podem fixar el DNA dels bacteris d'una colònia sobre una membrana, permetent així diferenciar les colònies entre elles després de la hibridació. El mètode deriva del que es va posar a punt per provar la presència de DNA clonat dins els bacteris recombinants per Grunstein i Hogness (1975) sobre *E. coli*. En aquest cas la lisi cel·lular s'efectua fàcilment en un medi alcali. Per els bacteris làctics el tractament no és suficient i per tant es necessita una incubació prèvia amb lisozima diluïda en Tris-glucosa per obtenir els protoplasts.

Es procedeix de la següent manera:

- Es sembra el cultiu bacterià en la superfície de MRS sòlid a una dilució suficient per obtenir entre 50-150 colònies per placa i incubem a 25°C en anaerobiosi durant 5 dies.

- La membrana de niló (HybondTM-N+, Amersham) de diàmetre igual al de la placa de Petri, és col.locada delicadament sobre el medi contenint les colònies, les quals són transferides per simple aplicació de la membrana durant alguns minuts, tenint compte de no fer-la moure una vegada col.locada. Tres minuts després es retira verticalment, verificant que les colònies s'hi han adherit.

A continuació la membrana serà tractada amb diverses solucions de manera que 0,45 ml de cada una d'elles seran posades sobre una pel.lícula de plàstic; la membrana és col.locada per damunt tenint en compte que les colònies quedin en la part superior i que el líquid no la sobrepassi, la qual cosa podria provocar la barreja de les colònies.

- Posar el filtre sobre una solució de lisozima de 10 mg/ml diluïda en 50 mM tris-glucosa i incubar a 37°C durant 45 minuts. La lisozima trenca la paret cel.lular i ens permet d'obtenir els protoplasts.

- Rentar el filtre durant 7 minuts en una solució de 1,5 M NaCl + 0,5 M NaOH que permet trencar els protoplasts.

- Rentar el filtre durant 3 minuts dues vegades amb 1,5 M NaCl + 0,5 M Tris + 0,001 M EDTA. Aquesta solució permet d'incloure el DNA en un tampó i protegir-lo gràcies al EDTA el qual impedeix l'acció de les nucleases i al mateix temps, prepara i neteja el DNA per a la posterior hibridació.

- Neutralització de la membrana amb 5x SSC durant 1 minut.

- Fixació del DNA amb 0,4 N NaOH durant 20 minuts.

- Rentar el filtre en 25 ml de 5 x SSC.

- El filtre pot ser hibridat seguidament o bé guardat a 4°C dins un sac de plàstic hermètic per ser hibridat més tard.

L'eficàcia de la lisi no és sempre completa, per això és important d'utilitzar cultius no massa vells de manera que la paret cel.lular no estigui massa reforçada. Les colònies utilitzades durant el nostre treball s'incuben un màxim de 5 dies. Aquesta és la principal dificultat trobada en l'aplicació del mètode.

2.5.7 - Marcatge del DNA i hibridació amb sondes radioactives

a) Preparació d'una sonda de DNA fàgic marcat amb ³²P per, la tècnica de desplaçament de tall (Nick-translation).

Aquesta tècnica va ser descrita per Rigbi *et al.* (1977). Es basa en l'acció combinada de dos enzims: la DNA pol I i la DNAsa I. Aquesta és una endonucleasa que en presència

d'ions Mg^{++} talla independentment cada una de les cadenes de DNA (els llocs de tall són distribuïts aleatòriament) lliberant extremitats 3'OH. A partir d'aquestes extremitats, la DNA pol. I sintetitza una nova cadena nucleotídica gràcies a la seva activitat polimerasa 5'---->3' i al mateix temps degrada els nucleotíds adjacents al tall per la seva activitat exonucleasica 5'---->3'. Si la reacció s'efectua en presència de dNTP radioactiu marcat per ^{32}P en α , la cadena sintetitzada estarà marcada radioactivament.

- Posar en un tub ependorf els reactius de marcatge en l'ordre següent:

DNA fàgic en una quantitat entre 75ng-150ng

Nick-translation-Cocktail (NTCK)

1 μ l de DNA Polimerasa I a 10000 u/ml

1 μ l de [α - ^{32}P] dCTP a una concentració de 10 μ Ci/ μ l (370 kBq/ μ l)

Les quantitats de cada un dels reactius depenen del volum final de marcatge; quan més gran sigui la quantitat de DNA que es vol marcar el volum final també ha de ser més gran per obtenir un marcatge òptim. Les proporcions són les següents:

DNA fàgic	1 μ l	1 μ l	1 μ l
dCTP ^{32}P	1 μ l	2-3 μ l	4-5 μ l
NTCK	8 μ l	16 μ l	24 μ l
DNA Pol. I	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Volum final	11 μ l	20-21 μ l	30-31 μ l

Composició del NTCK:

0,5 mM dATP, dTTP, dGTP

500 mM Tris HCl pH 8

50 mM $MgCl_2$

100 mM mercaptoetanol

500 μ g/ml BSA (solució d'albumina bovina al 10%)

20 pg/ml DNAsa I

-Incubar a 16°C durant 2 hores. després es para la reacció amb la solució TE+SDS 0,2% afegint el volum necessari per arribar a 300 μ l de volum final.

- Guardar la sonda a -20°C en un contenidor de plom.

b) Càlcul de l'activitat específica de la sonda

El comptatge es fa sobre 3 μ l que coresponen a una centèsima part de la sonda. Aquest volum és posat dues vegades sobre dos troços de paper Whatman i el DNA marcat

es queda fixat sobre el paper. Una de les mostres (mostra 1) és rentada durant 5 minuts dues vegades en 50 ml de TCA 5% el qual precipita els nucleotids que no formen part de la sonda (la mostra 2 no serà tractada amb TCA). Seguidament les dues mostres es renten amb alcohol per eliminar les restes d'aigua i a continuació s'inclouen en el líquid d'escintil·lació.

El comptatge ens dona els cpm d'una centèsima part de la mostra. Per fer el càlcul dels cpm de tota la sonda utilitzem la fórmula següent:

Activitat específica (cpm/ μ g DNA) = cpm/ng DNA marcat x factor de dil·lució x 1000 ng/ μ l

Rendiment d'incorporació = cpm de mostra 1 x 100 / cpm de mostra 2

Ens dona el percentatge d'incorporació al DNA dels nucleòtids marcats radioactivament.

Quan l'activitat específica es igual o més gran de 10^6 cpm/ μ g DNA es considera que el marcatge és bo i la sonda es utilitzable per a la hibridació. Si l'activitat específica és elevada es pot permetre una incorporació més petita per obtenir el mateix resultat.

c) Condicions d'hibridació amb la sonda radioactiva

Una primera etapa és la prehibridació la qual permet de saturar els llocs no específics del DNA. La membrana s'introdueix dins un sac de plàstic contenint 10 ml de la solució d'hibridació 1M NaCl, 1% SDS (p/v) i s'incuba durant 15 minuts a 65°C. L'hibridació pròpiament dita s'efectua en el mateix tampó després d'haver afegit la sonda desnaturalitzada per ebullició durant 10 minuts i addicionada de 100 μ l de DNA d'esperma de salmó (9.8 mg/ml). L'activitat específica és de l'ordre de 10^7 cpm/ μ g de DNA. La hibridació dura al voltant de 16 hores a 65°C sota agitació.

L'especificitat de les hibridacions és obtinguda per rentats successius de la membrana cada vegada més selectius per la seva força iònica. La membrana es rentada successivament per dos incubacions de 5 minuts a temperatura ambient en el tampó 2 x SSC 1% SDS i dos incubacions de 30 minuts a 65°C en el tampó 0,1 SSC + 1% SDS.

Els rentats poden ser més o menys astringents, depenent de dos factors, la concentració de NaCl i la temperatura. L'astringència és donar condicions desfavorables per a la formació d'híbrids (la doble cadena), es a dir, desafaboreix la hibridació.

L'asrtintència en una hibridació s'aconsegueix disminuint la quantitat de sals i augmentant la temperatura en els rentats. Contràriament les altes concentracions de sals acceleren la velocitat de formació d'híbrids estabilitzant la dúplex i comportant aparellaments

erronis. Quan les concentracions de sal són febles (0,01 - 0,1 M) la T_m (temperatura mitjana de fusió) varia de 16°C cada vegada que la concentració de sals canvia en un factor de 10.

Els ions divalents tenen un efecte més pronunciat encara sobre la T_m que els monovalents.

La temperatura ideal d'hibridació DNA-DNA es: $T_h = T_m - 25^\circ C$

La membrana és seguidament posada en autoradiografia a -80°C utilitzant una pel·lícula radiogràfica (KODAK X-OMAT 5S) entre dues plaques amplificadores (Cronex Lighting Plus, Du Pont de Nemours)

2.5.8 - Marcatge i hibridació amb sondes no radioactives

La tècnica de marcatge i hibridació es fa utilitzant el kit de Boehringer Mannheim "DNA labeling and detection nonradioactive" el qual es basa en la incorporació d'un anàleg de nucleòtid per la tècnica d'encebat a l'atzar (*random primed*), marcat amb la digoxigenina (digoxigenin-11-dUTP).

a) Preparació de la sonda

Se segueixen els passos següents (s'han fet algunes modificacions respecte al protocol aconsellat):

- La quantitat de DNA que es marca pot estar entre 3µg-10 ng resuspesos en un volum determinat. Aquest ha de ser lineal i purificat.
- Desnaturalitzar el DNA durant 10 minuts.
- Afegir:
 - 2 µl de barreja de hexanucleòtid
 - 2 µl de dNTP
 - afegir aigua estèril fins a un volum de 19 µl
 - 1 µl del fragment de Klenow de la polimerasa I
- Incubar a 37°C durant tota la nit perquè la pol. I incorpori els nucleòtids.
- Afegir 2 µl d'EDTA 0,2 M pH 8 per parar la reacció.
- Precipitar el DNA amb:
 - 2,5 µl LiCl 4M
 - 75 µl etanol 70% (guardat a -20°C)
- Incubar els tubs a -20°C durant 2 hores o bé 30 minuts a -80 °C i centrifugar durant 10 minuts a 12000 xg.

- Eliminar el sobrenadant i rentar el sediment amb 40 ml d'etanol de 70% fred (guardat a -20°C) i centrifugar.
- Llançar el sobrenadant i eixugar el DNA al buit o bé en un bany sec a 65°C.
- Resuspendre el sediment en 50 ml de TE .
- Incubar durant 30 minuts a 37°C.
- Guardar la sonda a -20°C.

b) Condicions d'hibridació

- La membrana ha de ser prèviament prehibridada en el següent tampó:

5 x SSC

0,1% N-lauroylsarcosina (Sigma)

0,02% SDS

1% Reactiu bloquejant

qsp 20 ml amb la solució T1 (100 mM trisHCl + 150 mM NaCl, pH 7,5).

La solució es dissol a 65°C durant 15 minuts abans de la prehibridació.

El volum de solució utilitzat depèn de les dimensions de la membrana. Per a 10 cm² utilitzem 50 ml de solució i per a 100 cm², 20 ml de solució.

- Es prehibrida durant 60 minuts a 65°C, després s'elimina la solució de prehibridació i s'afegeix la solució d'hibridació en una quantitat d'1 ml per 10 cm² i de 2,5 ml per 100 cm². Després s'afegeix la sonda prèviament desnaturalitzada. La quantitat de sonda utilitzada és de 10 ng de DNA per ml de solució d'hibridació.
- La hibridació dura tota una nit a 65°C i es fa en un forn d'hibridació HYBAID.

c) Revelat de la membrana

- Després de la hibridació la sonda és recuperada i guardada a -20°C per ser reutilitzada posteriorment fins un màxim de tres vegades. La membrana és primerament rentada en dues solucions per tal d'eliminar l'excés de sonda que està adherida inespecíficament a la superfície de la membrana i després es continuen els rentats per a la revelació. Les quantitats marcades a continuació són per a una membrana de 100 cm².

c.1.- Rentats per eliminar la sonda:

- Rentar dues vegades durant 5 minuts a temperatura ambient en 100 ml de la solució 2x SSC + 0,1% (w/v) SDS per tal d'eliminar la sonda que no està fortament adherida a la membrana. Les condicions són lleugerament astringents.

- Rentar dues vegades durant 20 minuts a 65°C amb 0,1x SSC + 0,1% (w/v) SDS. Amb aquest segon rentat aconseguim eliminar la sonda adherida a llocs no específics de la membrana i les condicions són més astringents.

Quan es vol augmentar l'astringència el que es fa és fer els dos rentats a 65°C amb 0,1x SSC.

c.2.- Rentats per al revelat:

- Rentar el filtre amb la solució T1 durant un minut.
- Incubar en 100 ml d'una solució T2 (reactiu bloquejant de 0,5 % en T1 pes/volum durant 30 minuts a temperatura ambient).
- Rentar amb el tampó T1 durant 1 minut. .
- Incubar amb l'anticòs del kit (4 µl en 20 ml de tampó T1) durant 30 minuts a temperatura ambient
- Rentar amb 50 ml de T1 dues vegades durant 15 minuts per eliminar tot l'anticòs que s'ha adherit a la membrana inespecíficament. Si aquest rentat no es fa bé podem tenir una lleugera coloració de fons en el filtre la qual podria impedir veure les senyals d'hibridació febles.
- Rentar amb 40 ml del tampó T3 (100 mM trisHCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl).
- Incubació amb 8 ml de la solució colorant (45 µl NBT, 25 µl X-Fosfat, 10 ml T3).
- La reacció de coloració es produeix al resguard de la llum. El temps de revelació és variable, pot anar de 15 minuts a 5-6 hores podent arribar a necessitar fins a 12 hores, depenent del tipus de DNA que s'ha hibridat i de la quantitat d'homologia que presenta. Una vegada fet el revelat dels filtres es poden treure del sac de plàstic i deixar-los eixugar a temperatura ambient.

2.5.9 - Altres metodologies utilitzades

Per a l'obtenció d'una part dels resultats, ha calgut modificar alguns protocols descrits prèviament. Aquestes metodologies modificades són descrites al mateix apartat de resultats, dins de cada subapartat, per tal de facilitar la comprensió de les experiències realitzades.

3 - RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1. - INDUCCIÓ DELS BACTERIÒFAGS EN LES SOQUES LISOGÈNIQUES DE *LEUCONOSTOC OENOS*

L'existència de la lisogènia en soques de *Leuconostoc oenos* aïllades dels vins de Bordeus no havia estat verificada fins aquest moment, si bé aquest fenomen ha estat estudiat previament en *L. oenos* de vins alemanys (Arendt *et al.*, 1991). El fet que aquests bacteris puguin actuar com a reserva de bacteriòfags i donar lloc, en determinades condicions, a bacteriòfags virulents conduint a la desaparició de la població bacteriana, ha motivat el desenvolupament d'aquest treball. L'existència de bacteriòfags en el vi durant la fermentació malolàctica podria explicar, en alguns casos, la dificultat de què aquesta s'iniciï o bé que és pari una vegada començada. Per això es fa absolutament necessari l'estudi de la flora indígena en quant a la seva capacitat d'induir els profags.

L'obtenció d'una col·lecció de bacteris aïllats directament del vi i provinents de diferents punts de la regió bordelesa ens ha permès de fer primerament una selecció entre les lisogèniques i les no lisogèniques la qual ens donarà a conèixer el percentatge d'aquest fenomen en la natura.

3.1.1 - Inducció amb mitomicina C de les soques de col·lecció

El DNA dels bacteriòfags es pot trobar en alguns casos integrat en el cromosoma bacterià, formant una associació molt estable anomenat estat de lisogènia. Aquesta associació pot durar tant de temps com el repressor del bacteriòfag impedeixi la transcripció dels gens que controlen la lisi (Lee, 1978). No obstant, en presència d'agents inductius actius, el repressor esdevé inactiu i els gens que controlen la multiplicació del fag es tornen actius, en conseqüència el DNA viral és induït formant una partícula vírica causant la lisi i mort de la cèl·lula (Huggins *et al.*, 1977).

L'agent inductiu utilitzat en aquest treball és la mitomicina C (MC). La elecció d'aquest antibiòtic respecte d'altres agents inductius, com la radiació UV, ha estat deguda a la seva facilitat de manipulació i d'optimització de les condicions de treball.

La MC és un dels pocs antibiotics coneguts capaç de reaccionar de forma covalent amb el DNA tant *in vivo* com *in vitro* (Tomasz *et al.*, 1974). La seva propietat d'agent mutagen s'explica perquè és capaç d'intercalar-se dins el DNA. Aquesta integració es produeix preferentment a nivell de la seqüència dinucleotídica G-T produint danys a la molècula de desoxiguanosina (Ueda i Komano, 1984). Les mutacions produïdes en el DNA a nivell del repressor (repressor de les funcions dels gens fàgics que codifiquen per la seva multiplicació) provoquen l'activitat dels gens virals i la inducció del profag.

Les 280 soques de *Leuconostoc oenos* de la col.lecció ICEB van ser posades en cultiu en dos tubs de 10 ml de MRS i incubades a 25°C. La mitomicina va ser afegida a un dels tubs, en una concentració final de 1 µg/ml, després de 24 hores d'incubació. Totes les soques es troben al començament de la fase exponencial de creixement, encara que la Abs₆₀₀ varia entre elles. El fet que es tractin un nombre elevat de soques al mateix temps, fa que la fase de creixement no sigui exactament la mateixa en totes elles. Aquesta concentració de MC (1µg/ml) fou escollida en base al que s'havia trobat en la bibliografia i fou considerada com la més adequada posteriorment, tal com s'exposa a l'apartat 3.1.3.

La Abs₆₀₀ de les diferents soques es troba entre 0,1 i 0,4 en el moment d'afegir la MC; després es continuen les mesures fins a 56 hores després de la sembra. La Figura 3.1 mostra algunes de les corbes obtingudes entre les diferents soques provades en les quals es poden veure diferents comportaments.

D'entre les diferents respostes de totes les soques a la MC s'han pogut veure quatre tipus de corbes diferents:

a- Les soques que presenten un creixement semblant en el tub control i en el tub amb MC. La presència de MC inhibeix lleugerament el creixement però no l'impedeix. No s'observa en cap cas una baixada dràstica de la població bacteriana. Les corbes que podem obtenir estan representades per les soques: DV47.10, DV36.6, DA3.2.

b- Les soques que presenten una clara baixada de Abs₆₀₀: aquesta és susceptible de ser traduïda per la presència de fags. La disminució de la població bacteriana es dona al cap de 36 h després d'haver afegit la MC. Aquest comportament és típic dels bacteris lisogènics i el trobem representat en les soques DV42.3, DV13.6, DV44.4, DV40.4, DV49.9, DV35.5, DA43.5.

c- Les soques que presenten una inhibició del creixement rapidament després d'afegir la MC. Aquest comportament pot ser confós a vegades per una inducció de bacteriòfags sense que sigui així veritablement. El que fa la MC en aquest cas és impedir la multiplicació bacteriana.

Es difícil poder assegurar que la soca és lisogènica, en aquest treball el que s'ha fet és considerar-la lisogènica quan en la fase final hi ha una petita baixada de la Abs₆₀₀, com en el cas de les soques DA19.4, DV40.6 i DA30.3. Si el creixement és completament inhibit és considera que no hi ha hagut inducció com en el cas de la soca DV37.8.

d- Les soques que són insensibles a la MC i el seu creixement no és inhibit, en tot cas a una concentració de 1 µg/ml de MC. Dos exemples d'aquest comportament són les soques DA44.7 i D33.1.

La fase de creixement del bacteri és molt important en el moment d'afegir la MC. El moment òptim d'actuació és al començament de la fase exponencial de creixement. Si el cultiu ha crescut massa ens trobem amb resultats que donen falsos negatius.

Quan la MC s'afegeix a una Abs₆₀₀ superior a 0,4, poques vegades s'obté una corba típica d'inducció de fags. Si es repeteix l'experiment afegint la MC a una Abs₆₀₀ de 0,2, el resultat pot variar i haver-hi una inducció.

De les 280 soques provades en un primer tractament, 106 han donat un resultat positiu a la MC. hi ha per tant un 45% de soques lisogèniques.

Els tubs que presenten inducció (lisats) són filtrats i guardats a 4°C per a una posterior verificació, en medi sòlid, de la presència de fags.

3.1.2 - Verificació de l'inductibilitat de les soques

Les soques que presenten una baixada de la Abs₆₀₀ després d'haver afegit la MC són considerades, en una primera fase com a soques lisogèniques, i susceptibles de haver induït el profag.

El paper de la MC és el de provocar danys en el DNA a nivell de repressor dels gens del fag perquè aquest pugui ser induït, però una vegada s'ha desencadenat el procés de

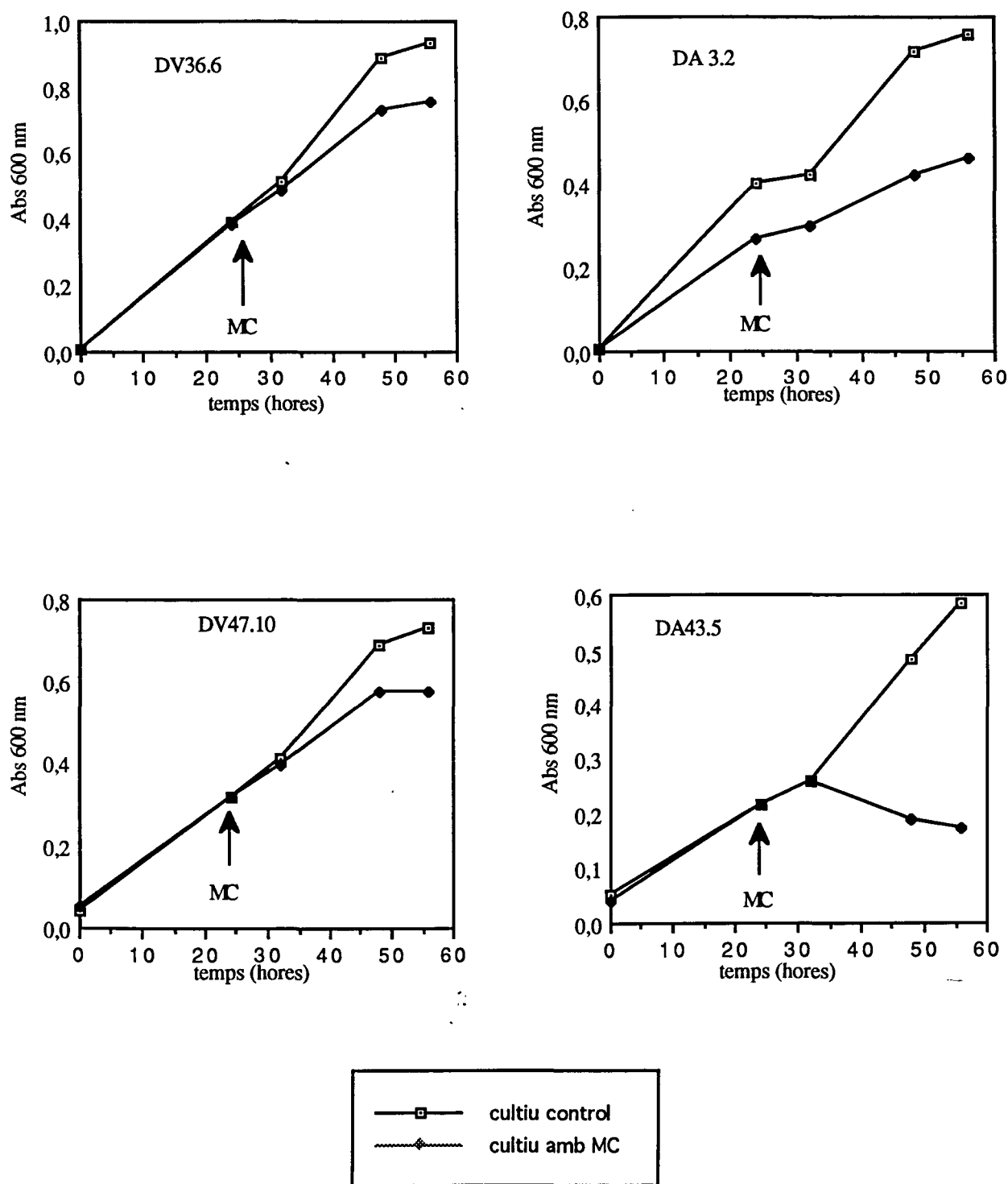
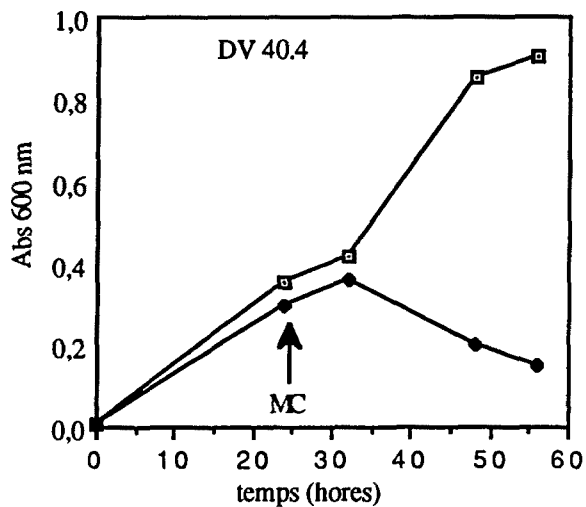
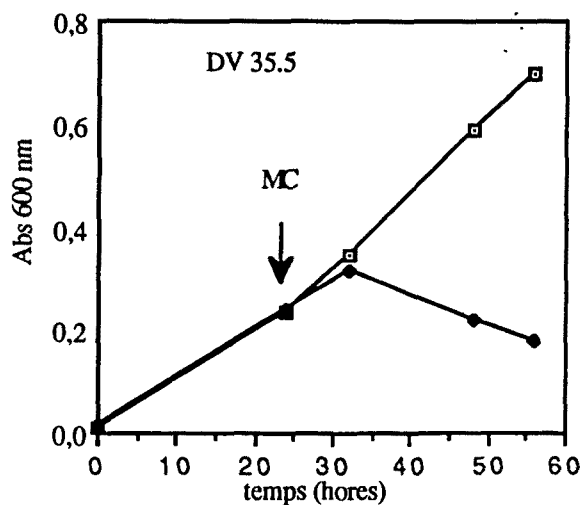
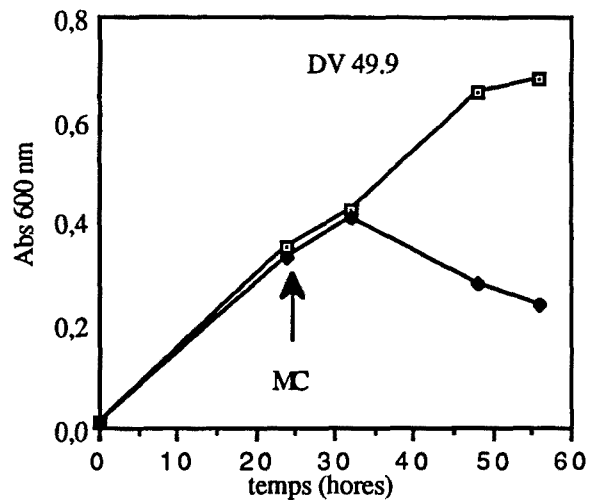
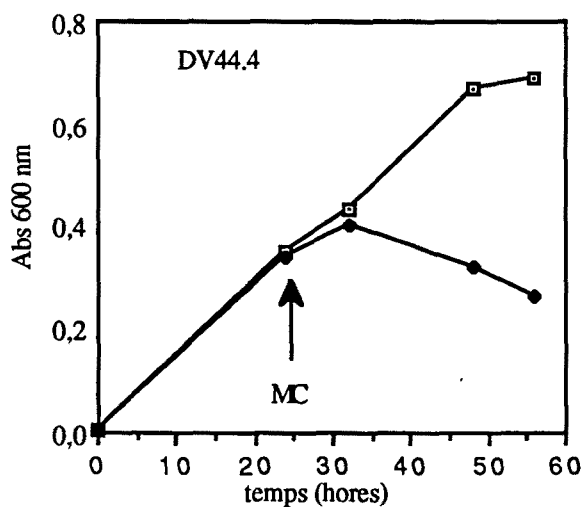
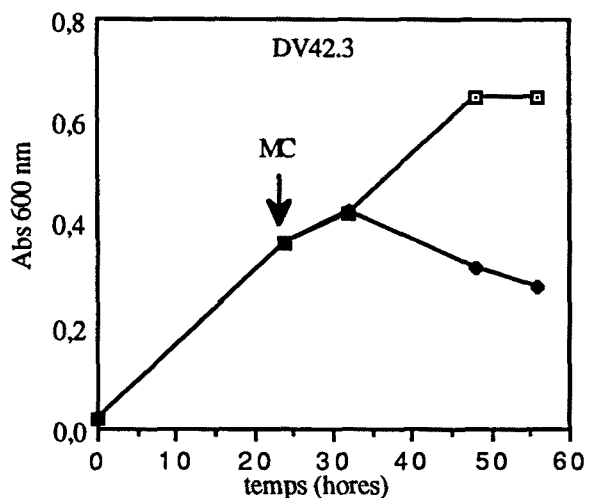
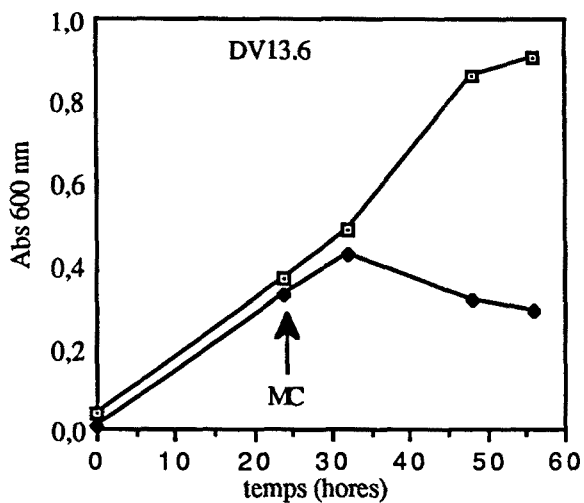
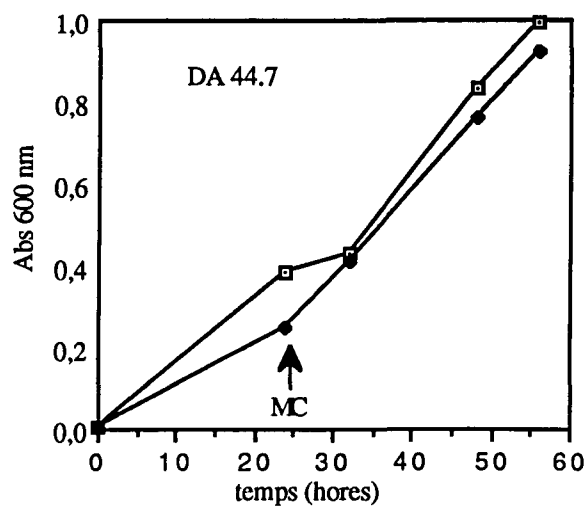
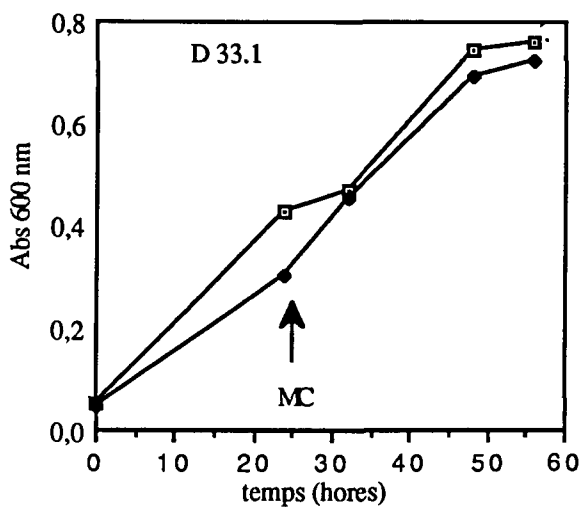
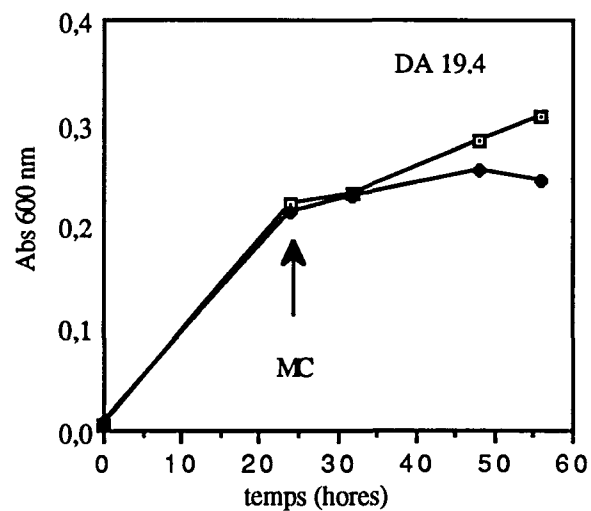
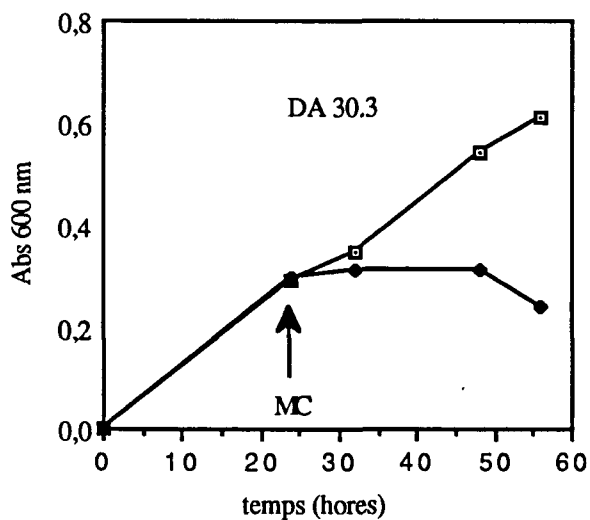
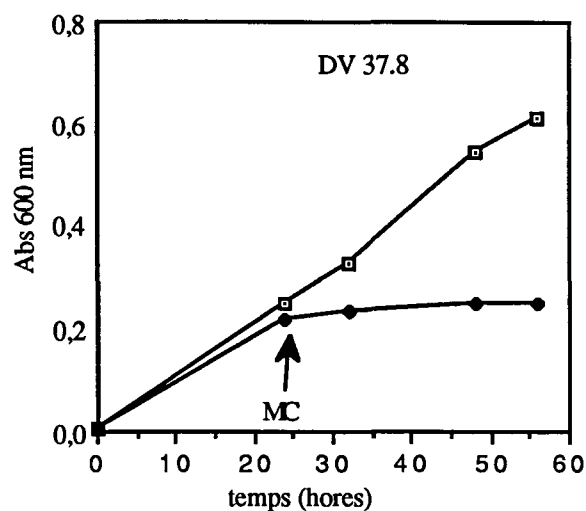
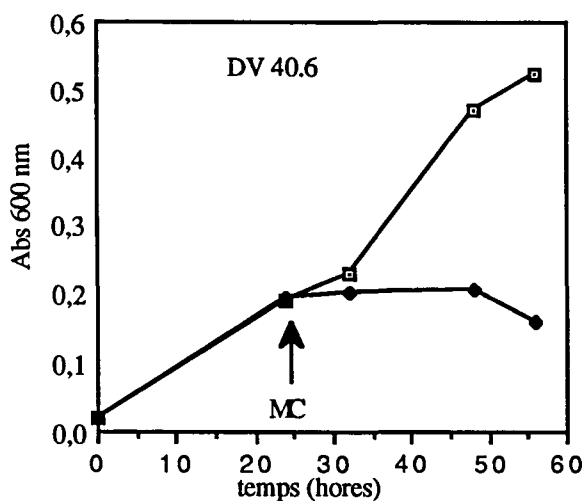


Figura 3.1 : Corbes de creixement obtingudes després d'haver afegit la mitomicina C a 16 sòques de *L. oenos*, comparades amb un cultiu control sense MC





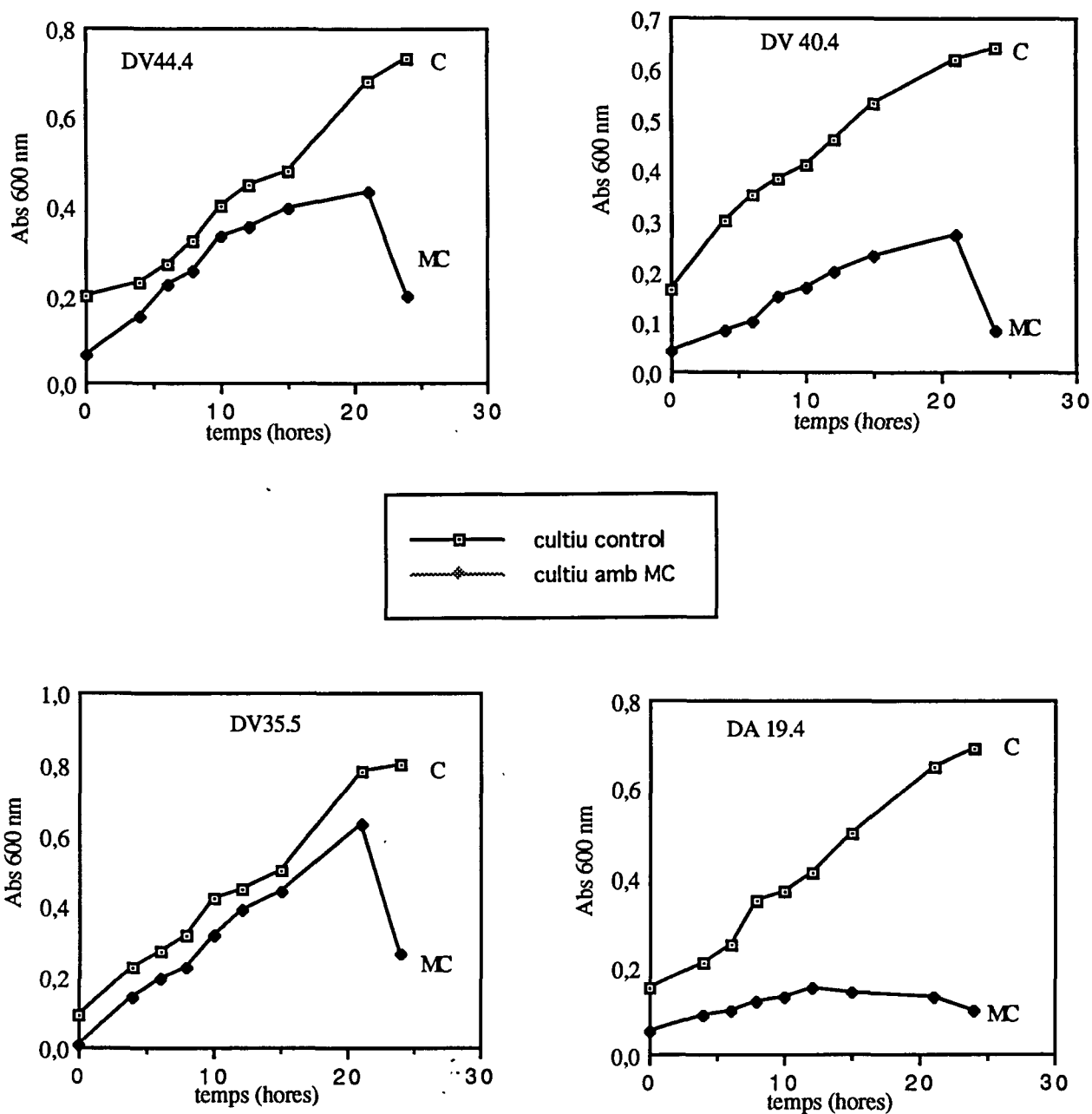


Figura 3.2 : Corbes de creixement obtingudes de quatre sòques (DA19.4, DV35.5, DV40.4, DV44.4) tractades amb MC, després que aquesta va ser eliminada del medi de cultiu.

multiplicació del fag s'ha de preservar de la presència de MC perquè aquesta no afecti el seu DNA i és puguin formar les partícules fàgiques. A més, l'acció continuada de la MC sobre els bacteris podria provocar una inhibició del creixement bacterià que podria ser confós amb una inducció de bacteriòfags.

Per verificar que s'ha produït realment una inducció, quatre soques d'entre les que s'havien considerat MC positives (inducció del profag), DA 19.4, DV 35.5, DV 40.4, DV 44.4, van ser provades una segona vegada amb MC a la mateixa concentració que la primera vegada, 1 µg/ml. Els lisats obtinguts després de 8 hores d'incubació a 25 °C van ser centrifugats 15 minuts a 12000 xg per tal d'eliminar la MC, la qual podria inhibir el desenvolupament dels fags degut a la seva capacitat d'impedir la síntesi del DNA, els *pellets* són rentats dues vegades amb 5 ml de solució salina i després inoculats a 10 ml de MRS. El tub control segueix el mateix tractament. S'ncuba a 25°C durant 24 hores.

Podem veure (Figura 3.2) que l'efecte de la MC és diferent després d'un segon tractament en el cas de la soca DA 19.4, on es pot veure que el creixement és exponencial igual que pel cultiu sense MC. La disminució de cèl.lules respecte del control és deguda als efectes mutàgens que ha pogut produir la MC a una part de la població bacteriana durant el temps d'incubació. El comportament de soca lisogènica que havíem observat en una primera fase, pot ser degut a la inhibició que produeix l'antibiòtic sobre el seu creixement i no la inducció d'un profag. En el cas de la soca DV 40.4 el que observem és un creixement ralentitzat amb una caiguda de la Abs₆₀₀ al cap de 22 hores, comportament típic de les soques lisogèniques. Per a les soques DV 35.5 i DV 44.4 el comportament és similar, hi ha una forta baixada de la Abs₆₀₀ després d'un creixement normal, efecte sens dubte de la inducció del profag.

La utilització de la MC per provar la lisogènia d'un gran nombre de soques representa un problema en qüestió de rapidesa del mètode. La repetició del test per les soques que no presenten una corba típica d'inducció és absolutament necessària com veiem en els exemples anteriors. No obstant és un mètode molt útil per la seva facilitat de manipulació en la inducció dels fags quan es treballa amb un nombre limitat de soques.

3.1.3.-Influència de la concentració de mitomicina C sobre la inducció de les soques

La inducció de les soques lisogèniques de la nostra col·lecció és va fer utilitzant una concentració de MC de 1 µg/ml, com s'ha especificat en l'apartat anterior, en base al que s'havia trobat en la bibliografia sobre aquest tema i donant en el nostre cas bons resultats en

la inducció. No obstant s'ha volgut comprovar si concentracions diferents de MC podien donar un comportament similar per a la soca o bé si es modificaven els resultats obtinguts.

Dues soques lisogèniques, DV44.4 i DV35.5, han estat induïdes amb diferents concentracions de MC: 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml i 5 µg/ml procedint de la mateixa manera que en les experiències anteriors. Les dues soques han estat triades perquè el seu comportament després del tractament amb la MC és el d'una soca lisogènica típica. Partint de 50 ml de cultiu de dues soques diferents, cada cultiu es reparteix en alíquotes de 10 ml, els quals seran induïts amb diferents concentracions de MC.

Els resultats mostren que en les dues soques, a una concentració de 1 µg/ml, es produeix la lisi de la població després d'un temps de creixement exponencial, corba típica d'una inducció de fags. A 5 µg/ml es produeix una inhibició completa del creixement ja que l'excés de MC produeix, sens dubte, nombrosos danys al material genètic de la totalitat de la població bacteriana i es produeix rapidament una lisi completa (Figura 3.3). Per les concentracions febles de MC, 0,1 i 0,5 µg/ml, el creixement de les cèl.lules no sembla gaire afectat comparat al del cultiu control ja que es pot comprovar que hi ha creixement exponencial de gran part de la població bacteriana. La lleugera disminució que s'observa respecte del cultiu control és provocada pels efectes lleus de la MC com a agent mutagen.

Per confirmar aquests resultats, es va eliminar la MC del medi mitjançant centrifugació (12000 g durant 10 minuts), rentat del *pellet* amb solució salina i resuspensió en 10 ml de MRS. Després es va seguir novament el creixement d'aquest cultiu seguint la seva Abs₆₀₀ durant 48 hores (Figura 3.4).

De la mateixa manera que en la figura 3.3, en aquest cas veiem també clarament una baixada de l' Abs₆₀₀ després d'un cert temps de creixement quan la concentració de MC és d'1 mg/ml, lisi deguda a la inducció dels profags. Aquesta concentració sembla ser la més favorable per a la inducció. A 5 mg/ml de MC la població bacteriana és completament lisada, de manera que no podem saber si hi ha inducció o no.

3.1.4 - Determinació de l'espectre d'hoste. Selecció d'una soca indicadora.

Fins ara l'única prova que teníem de la presència de fags en el medi era la baixada de l'Abs₆₀₀ durant el període de creixement exponencial després de la inducció amb la MC. No obstant, per poder verificar aquesta presència, el que interessa és trobar una o diverses soques de bacteris que siguin sensibles als diferents fags induïts. Aquestes soques sensibles

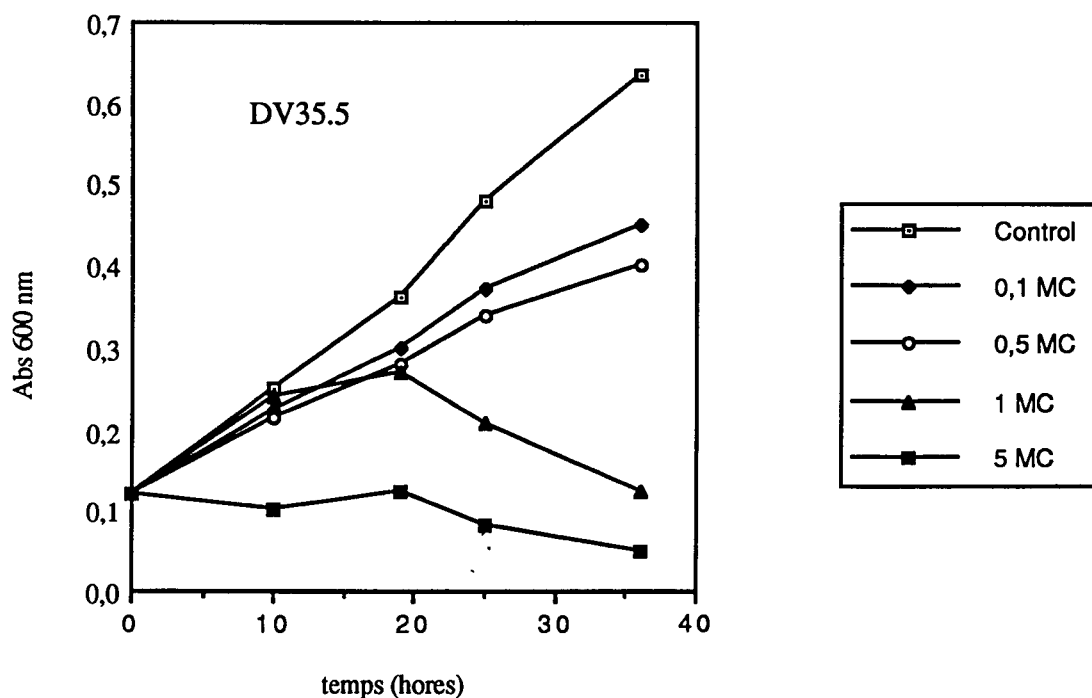
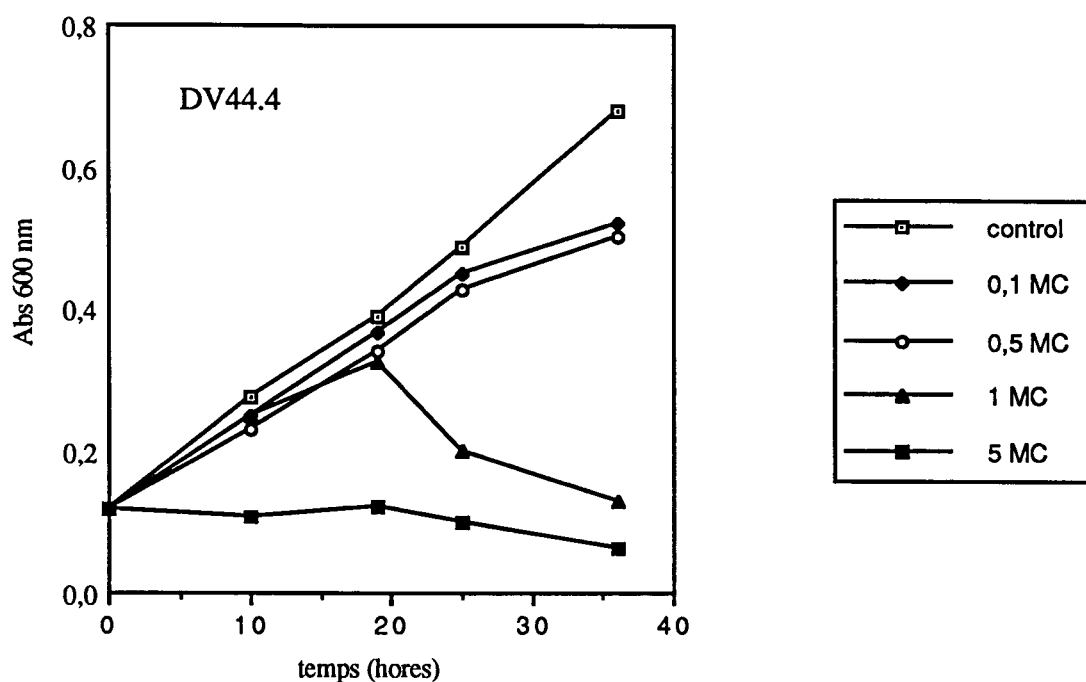


Figura 3.3: Corbes de creixement de dues sòques (DV44.4 i DV35.5) després d'haver afegit diferents concentracions de MC (0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml) comparades amb un cultiu control sense MC.

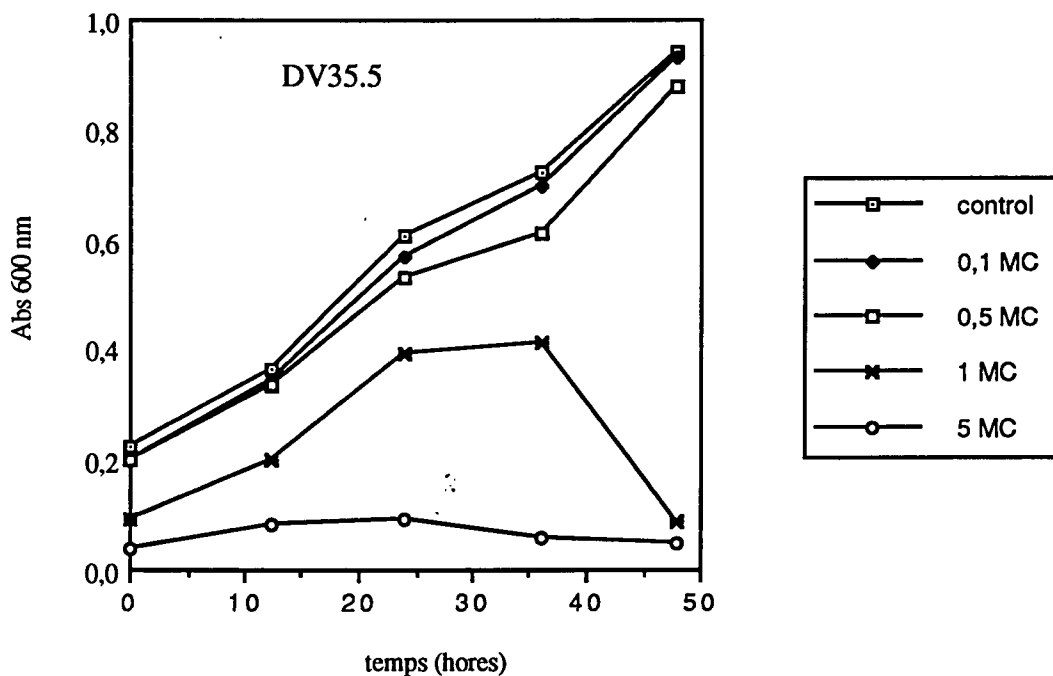
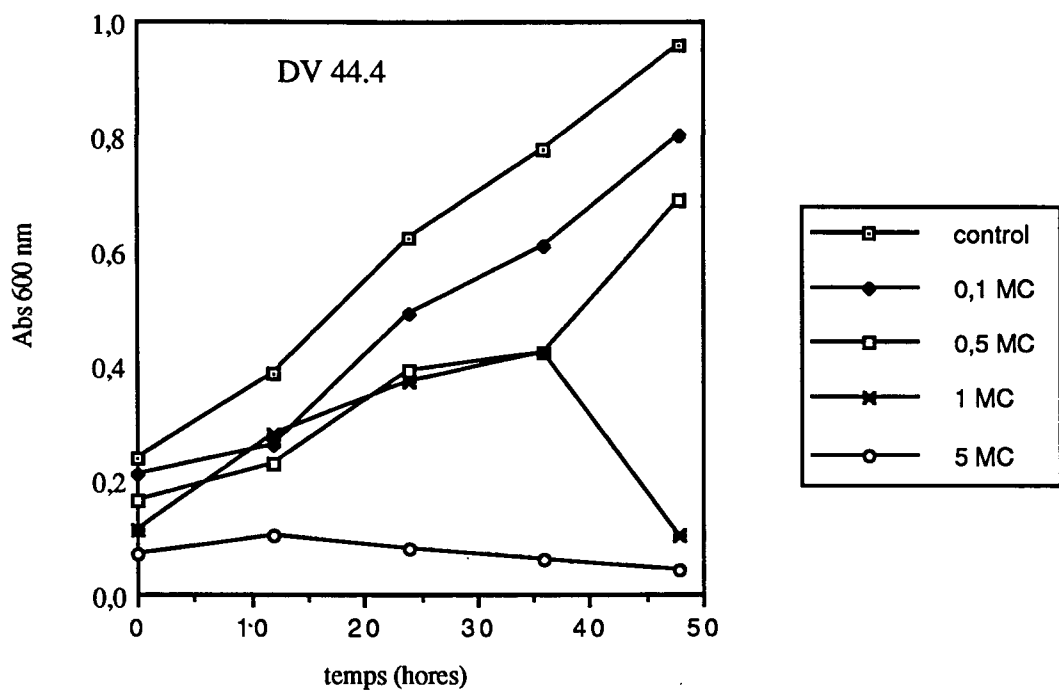


Figura 3.4 : Corbes de creixement de les soques DV44.4 i DV35.5 obtingudes després d'haver eliminat la MC del medi, comparades amb un cultiu control sense MC.

o indicadores serviran per posar en evidència la presència dels fags després de la inducció. Quan fem créixer en medi sòlid una soca indicadora en presència de fags es produeixen unes zones de lisi les quals anomenem clapes de lisi, que són la evidència de l'existència dels fags.

L'obtenció d'una soca indicadora és el primer pas per poder treballar amb els bacteriòfags. Sense aquestes soques no podem tenir mai l'evidència de l'existència dels fags, i que és el més important, tampoc no els podem multiplicar.

Per trobar les soques sensibles a cada un dels fags es va fer el seu espectre d'hoste que consisteix en determinar quines són les soques sensibles i resistents per cada un dels fags. La determinació de l'espectre d'hostes dels fags induïts provats ha permès determinar quines són els bacteris sensibles entre el conjunt de bacteris testats de la col·lecció ICEB, als diferents fags, per tal de tenir, com a mínim, una soca hoste per cada un d'ells. Cada un dels lisats serà provat sobre un gran nombre de bacteris, la qual cosa ens permetrà de veure quines són les soques que destaquen per un percentatge de sensibilitat elevada, de manera que pugui ser utilitzades com a soques indicadores en el nostre treball. La possibilitat d'utilitzar una sola soca com a hoste de la majoria de fags facilitarà molt el treball.

Quaranta dels lisats obtinguts a partir de la inducció amb la MC, els quals van ser guardats a 4°C, es van provar per a determinar el seu espectre d'hostes. El mètode utilitzat va ser el test de la gota, el qual permetia de provar 8 fags per placa de Petri. La presència d'una zona de lisi sobre el tapís bacterià, ens indicava presència de fags. La taula 3.1 mostra el nombre de soques sensibles que poden tenir els diferents fags provats.

Taula 3.1: Nombre de soques sensibles que tenen els fags provats.

Nombre de soques sensibles	Nombre de fags
0	2
1	6
2	11
3	11
4	6
5	3
6	1

L'absència de placa de lisi per a alguns dels lisats no ens assegura que no hi hagin partícules fàgiques infectives. En aquest cas hi ha la possibilitat, més petita com més soques es provin, de que no siguin soques sensibles per a aquests fags.

El nombre de bacteris sensibles per cada un dels fags varia entre no haver-n'hi cap a haver-n'hi 6. Es troben 22 dels fags capaços de lisar entre 2-3 soques, que com podem veure és el cas de la majoria. Només es troben 3 fags que infecten entre 5-6 soques. Finalment dos dels lisats no són capaços de lisar cap de les soques provades.

D'entre les soques sensibles és van seleccionar els que apareixien en un gran nombre de espectres d'hoste, cosa que va permetre donar percentatges de sensibilitat.

Pel que fa al percentatge de sensibilitat de cada soca, trobem que n'hi ha una que destaca perquè presenta una sensibilitat del 75%, valor alt comparat al de la resta de soques, és la soca D31.2; aquesta ha estat triada com a soca indicadora en aquest treball. Una altra de les soques que presenta també un percentatge elevat de sensibilitat és la EFA24 amb un 57%. Aquesta ha estat utilitzada també com a indicadora en alguns dels experiments.

El percentatge de sensibilitat de les soques provades és el següent:

D 31.2 -----	75%
EFA24 -----	57%
DV 29.2 -----	54%
Lo 28 -----	45%
DA 7.7-----	30%
DV 44.9-----	21%
DA 39.3-----	14%

Les soques que presenten menys del 30% de sensibilitat no s'utilitzaran com a soca indicadora excepte en els casos que siguin l'únic hoste d'alguns dels fags.

3.1.5 - Discussió i conclusions

El tractament amb la mitomicina C de les 280 soques de la col·lecció ICEB ens ha permès de fer una primera classificació entre les soques lisogèniques i no lisogèniques aïllades directament del vi. El percentatge obtingut és d'un 45% de lisogènia.

Com s'ha pogut veure, el test de la MC no presenta problemes a nivell de la seva aplicació en el laboratori però és molt sensible a la fase de creixement del bacteri, la qual cosa fa que sigui difícil la seva utilització quan es tracta de provar un gran nombre de soques i

donar percentatges de lisogènia en una determinada població natural. Malgrat aquest inconvenient, continua sent un test completament vàlid quan s'utilitza sobre un petit nombre de soques, de les quals podem seguir constantment el seu creixement.

En aquest treball, aquest test s'ha utilitzat constantment per verificar la condició de lisogènia de determinades soques i com agent mutàgen per induir els profags abans de la seva multiplicació.

La concentració més adient és la d'1 µg/ml. A concentracions més baixes veiem que el seu efecte no és suficient i els cultius de bacteris no es veuen realment afectats; al contrari, si la concentració és molt elevada, els danys provocats sobre el material genètic dels bacteris és massa gran i són lisades ràpidament sense permetre el creixement del bacteri i impeding la formació dels bacteriòfags.

La majoria de fags induïts a partir de les soques lisogèniques poden ser posats en evidència ja que quasi bé tots tenen al menys una soca sensible sobre la qual es poden multiplicar. Els que no tenen una soca hoste no els podrem utilitzar en el nostre treball per la impossibilitat de multiplicar-los.

En quant a la soca indicadora, d'entre les soques de la nostra col·lecció n'hem pogut trobar dues que són sensibles a un gran nombre de fags, especialment la soca D31.2, que ha estat utilitzada en la majoria de casos com a soca hoste. La soca DV29.2 presenta també una sensibilitat elevada però, com veurem més endavant, no ha estat utilitzada com a indicadora perquè es tracta de una soca lisogènica. Per últim la soca EFA24 ha estat utilitzada en alguns casos al principi del nostre treball, la seva utilització va ser molt útil quan encara no teníem una soca indicatriu de la nostra col·lecció. La resta de soques, encara que sensibles a alguns fags, han estat rarament utilitzades com a soques indicadores.

Aquests estudis preliminars sobre l'existència de la lisogènia en soques de *L. oenos* ens ha permès de veure que es tracta d'un fenomen relativament extès i que a partir d'ara caldrà tenir-ho en compte quan treballem amb les diferents soques, perquè l'existència d'un profag podria causar problemes durant la fermentació malolàctica en el vi, problemàtica que ja s'havia posat en evidència en els processos fermentatius d'indústries làctiques en les quals els fags són la causa de moltes parades de fermentació.

3.2. - OPTIMITZACIÓ DE LES CONDICIONS DE MULTIPLICACIÓ DELS BACTERIÒFAGS

Els estudis fets sobre els fags de *Leuconostoc oenos* són relativament escassos, ja que es coneix la seva existència i els seus efectes, però no la seva forma d'actuació. Les condicions òptimes de multiplicació no han estat encara ben descrites. El que esperem es arribar a titulacions elevades, de al voltant de 10^9 UFP/ml per tal d'obtenir una biomassa suficient per la continuació del nostre treball. Per això necessitem conèixer abans els diferents paràmetres del cicle biològic, tenint en compte diferents factors com la temperatura, pH, fase de creixement i concentració de Ca^{2+} .

Les cèl·lules sensibles als bacteriòfags són capaces de reproduir la partícula fàgica parental en milers d'exemplars. Les noves partícules fàgiques són idèntiques al fag parental. Tot el conjunt d'esdeveniments que van des de la penetració del genoma fàgic dins el bacteri hoste fins a l'alliberació dels fags de la descendència, defineixen el cicle de multiplicació dels bacteriòfags.

3.2.1.-Propagació dels bacteriòfags i lisi en medi líquid

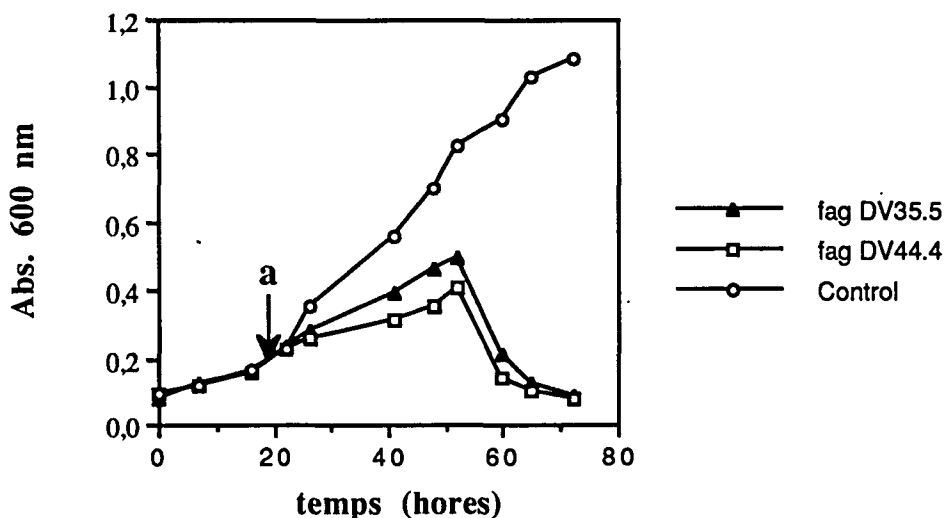
Sigui quin sigui el tipus de bacteriòfag que es vol posar en evidència s'ha de fer en base a una propietat fonamental: la propagació de la lisi i la seva especificitat a algunes de les soques.

El protocol utilitzat en el nostre treball per a la propagació dels fags en medi líquid han estat adaptats dels mètodes publicats per Accolas i Spillman (1979).

A fi d'obtenir una lisi en massa de la població bacteriana, ha estat necessària una etapa d'adsorció amb una multiplicitat d'infecció elevada abans que el cultiu comenci el seu creixement.

La soca D31.2 ha estat infectada amb dos fags Φ DV 35.5 i Φ DV 44.4 als quals s'ha comprovat que es sensible. La inoculació del cultiu ha estat feta quan aquest presentava una Abs_{600} de 0,230 amb un volum de lisat del 10% (v/v) a 10 ml de MRS. Al cultiu se li ha afegit 25 mM de $CaCl_2$.

Els resultats obtinguts després de la lisi estan representats a la Figura 3.5



a: moment en el qual s'afegeixen els fags al medi de cultiu.

Figura 3.5: corba de creixement de la soca D 31.2 infectada per dos fags diferents, Φ DV 35.5 i Φ DV 44.4.

L'efecte de la infecció fàgica en un cultiu es tradueix en una disminució de l'absorbència durant la fase exponencial de creixement, acabant per una baixada dràstica al cap de 48 hores d'incubació si es compara amb un cultiu control sense fags.

3.2.2.-Determinació dels diferents paràmetres del cicle de multiplicació

El mètode proposat per Ellis i Delbrück (1939), ens ha permès traçar una corba de creixement en la que s'hi poden definir els diferents paràmetres del cicle de multiplicació, mesurant el creixement quantitatiu dels bacteriòfags. Aquests paràmetres són: Període de latència, fase d'explosió i grandària d'explosió.

La progressió del cicle de multiplicació d'un fag es pot fer de tres maneres:

- a) Per titulació dels fags dins el sobrenadant del cultiu infectat, el qual ens dona la concentració de fags extracel.lular (fags alliberats per les cel.lules infectades).**
- b) Per la titulació de fags després de la lisi dels bacteris per addició de cloroform, la qual ens permet de mesurar la concentració de fags intracel.lular.**
- c) Per mesura de la variació de la terbolesa del cultiu (Abs_{600}).**

En aquest treball la corba de creixement dels fags s'ha fet a partir del comptatge de partícules fàgiques existents en el sobrenadant i fent després la diferència amb el nombre de fags afegit inicialment perquè no té els inconvenients de treballar amb el cloroform i és més precís que el mètode c.

La determinació d'aquests paràmetres s'ha fet sobre tres fags induïts a partir de soques lisogèniques: Φ DV44.4, Φ DV35.5 i Φ DV 40.4. A 0,5 ml de la soca sensible EFA24 incubada a 25°C durant 48h se l'hi ha afegit 0,5 ml d'un lisat donant una titulació final de $3,3 \cdot 10^9$ UFP/ml, i $CaCl_2$ a una concentració final de 25mM. S'incuba durant 30 minuts a 25°C per permetre l'adsorció dels bacteriòfags als bacteris. Després diluïm fins a un volum de 10 ml amb MRS i comencem el recompte de fags a diferents moments: 20 min, 30 min, 2 h, 4 h, 8 h, 10 h, 24 h. Durant aquest temps els cultius es mantenen a 25°C. Per al recompte de fags es pren una alíquota de 0,5 ml del cultiu, es centrifuga durant 10 minuts a 12000 xg i es recupera el sobrenadant en el qual hi comptarem els bacteriòfags. En aquest cas no es fa necessària la filtració de la mostra per fer el comptatge perquè la soca utilitzada en la multiplicació és la mateixa que utilitzarem per el comptatge en medi sòlid i el fet que puguessin quedar alguns bacteris no afectaria en res. El resultat obtingut per al fag Φ DV44.4 està representat a la Figura 3.6.

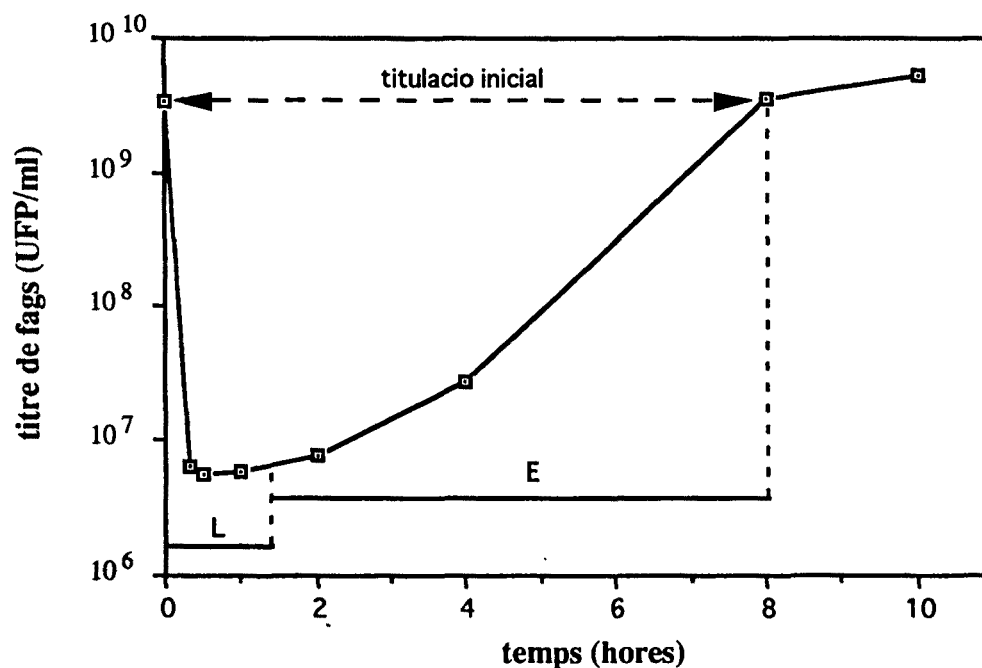


Figura 3.6: Cicle de multiplicació del fag Φ DV44.4 sobre el bacteri EFA24 a partir del comptatge dels fags lliures en el sobrenadant després de la infecció. L indica el temps de latència i E el període de explosió.

Durant el període de latència (L), el títol inicial de fags disminueix dràsticament degut a la seva adsorció a la superfície del bacteri. Els 30 primers minuts són suficients per permetre al fag de adsorbir-se al bacteri; després la titulació és manté quasi bé constant durant una hora i mitja: durant aquest temps el fag replica el seu DNA i s'encapsida. Aquest període de temps es coneix com període de latència. L'augment progressiu de la titulació en el sobrenadant indica l'inici de la fase d'explosió (E), durant la qual els bacteris infectats comencen a ser lisats. Aquesta fase s'acaba quan el nombre de fags és el mateix que l'inicial. El temps entre l'inici de la infecció fins al final de la fase d'explosió dura unes 8 hores. A partir d'aquest moment i fins a 24 hores el fag es multiplicarà fins arribar a una titulació de $6,9 \cdot 10^{10}$ UFP/ml.

La mateixa corba s'ha fet pels fags Φ DV35.5 i Φ DV40.4 obtenint resultats molt similars. En tots els casos la fase de latència no sobrepassa les dues hores i el període de explosió està als voltants de les 8 hores, després de 24 hores veiem un clar augment del nombre de fags.

La relació entre el nombre final de fags i el nombre inicial es coneix com tamany d'explosió o producció mitjana de fags per cel.lula infectada quan considerem que l'adsorció es completa; si no, cal dividir pel nombre de bacteris infectats. En el cas de Φ DV44.4

trobem un rendiment de 21 fags alliberats per bacteri infectat. Per a Φ DV35.5 i Φ DV40.4 el rendiment es de 32 fags/bacteri i 23 fags /bacteri respectivament.

En la Taula 3.2 es mostren els valors obtinguts per poder calcular la grandària d'explosió.

Grandària d'explosió = (n. final de fags - n. inicial de fags) / n. de bacteris infectats

Taula 3.2: Valors obtinguts en el comptatge de fags i bacteris en tres casos diferents per conèixer la grandària d'explosió.

	nº fags finals (UFP/ml)	nº fags inicial (fags/ml)	(a) bact. infectats (UFC/ml)	Grandària d'explosió
Φ DV 44.4	$7 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^9$	21
Φ DV 35.5	$9,2 \cdot 10^{10}$	$4 \cdot 10^9$	$2,7 \cdot 10^9$	32
Φ DV 40.4	$7 \cdot 10^9$	$3,2 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^8$	23

(a) El nombre de bacteris infectats s'obté per la diferència entre el nombre inicial, afegit abans de la infecció, i el nombre de bacteris comptat després de l'adsorció dels fags.

3.2.3 - Influència de la concentració de Ca^{2+} en la multiplicació dels bacteriòfags

Els ions Ca^{2+} faciliten l'entrada de molècules de DNA a través de la membrana fins a l'interior de la cel.lula. Això a fet pensar que els ions Ca^{2+} podrien ser necessaris en el cicle de multiplicació dels bacteriòfags per poder fer entrar més fàcilment el DNA fàgic dins la cel.lula.

Watanabe i Takesue (1972) van determinar el moment del cicle biològic en què el calci és específicament necessari. L'adsorció dels bacteriòfags al bacteri hoste i la seva multiplicació intracel.lular són independents de la presència de Ca^{2+} , aquest és solament necessari per a la penetració del genoma fàgic dins el bacteri hoste.

La quantitat necessària d'aquest ió divalent per obtenir una multiplicació òptima no està ben definida; en la bibliografia es troben quantitats diferents depenent de l'espècie

bacteriana o de les soques utilitzades en el treball. Per això s'ha volgut provar quina es la concentració més adient per a la multiplicació dels fags de la nostra col·lecció.

Diferents concentracions de CaCl_2 han estat provades, aquestes són: 0, 20, 25, 50, 100, 150 mM

Sis tubs amb 10 ml de MRS han estat sembrats amb la soca indicadora D31.2 i infectades amb el fag Φ D7.1 a una concentració final de $1,5 \cdot 10^8$ UFP/ml, a cada tub s'ha afegit una concentració diferent de CaCl_2 . S'ha fet un primer recompte immediatament després d'afegir el CaCl_2 , després s'incuben durant 48 hores a 25°C i el lisat obtingut és centrifugat, filtrat i comptats el nombre de fags, pel mètode de la doble capa, sobre la soca indicadora D31.2.

La titulació de fags respecte de la concentració de calci (figura 3.7) mostra que quan la concentració és de 25 mM de CaCl_2 s'obté el màxim de fags multiplicats. La diferència amb concentracions lleugerament més baixes (20mM) no és molt gran. Contràriament, quan les concentracions són molt elevades podem observar un efecte negatiu per la multiplicació.

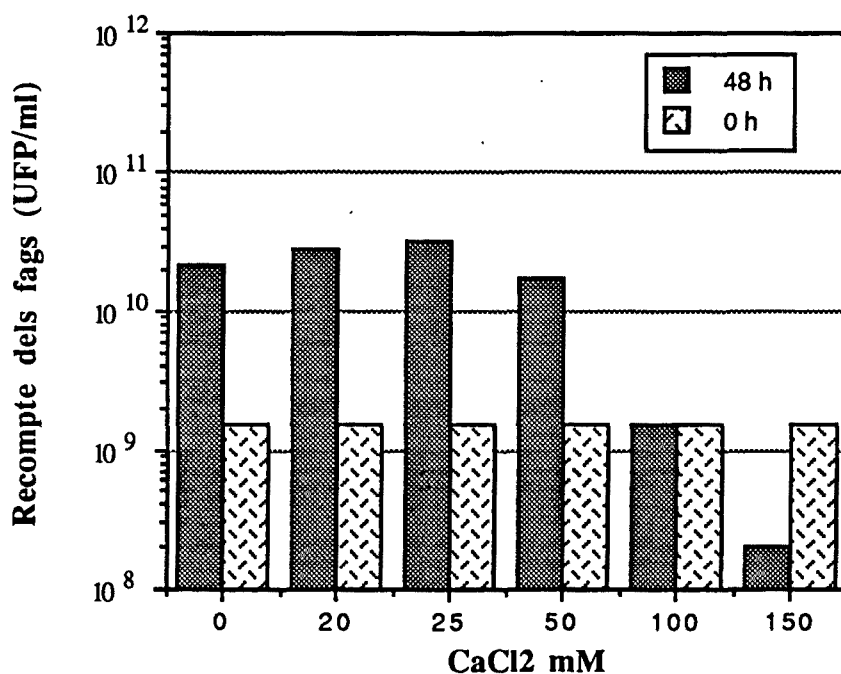


Figura 3.7: Recompte en UFP/ml de Φ D7.1 després de la seva multiplicació en medi líquid, a diferents concentracions de CaCl_2 .

Així doncs, amb aquests resultats es pot concloure que l'absència de Ca^{2+} no és necessàriament un factor limitant en la multiplicació dels fags, contràriament al que diu Reiter

(1956) el qual proposa la utilització de medis de cultiu sense Ca^{2+} per impedir la propagació dels fags.

En el nostre estudi veiem que és possible la multiplicació encara que no sigui la condició òptima per obtenir el màxim de fags. La importància de determinar la quantitat òptima de Ca^{2+} és que cal, la majoria de vegades, obtenir el màxim nombre de fags i per això interessa treballar en les condicions més favorables.

Contràriament als resultats obtinguts en medi líquid, quan la multiplicació es fa en medi sòlid, la presència de calci es fa absolutament necessària (Figura 3.8):

Un lisat de Φ D7.1, a una concentració de $1,5 \cdot 10^8$ UFP/ml, ha estat recomptat pel mètode de la doble capa, sobre la soca D31.2 amb les següents concentracions de CaCl_2 : 0, 20, 25 i 50 mM. Al cap de 48 hores es veu que quan no hi ha CaCl_2 en el medi no s'observen plaques de lisi, quan la concentració és de 20-25 mM les concentracions són les mateixes que en el lisat de partida i finalment, a una concentració de 50mM la titulació disminueix lleugerament.

En conseqüència les concentracions utilitzades en la resta d'aquest treball han estat de 25mM tant en el recompte de fags pel mètode de la doble capa, com per a la seva multiplicació en medi líquid.

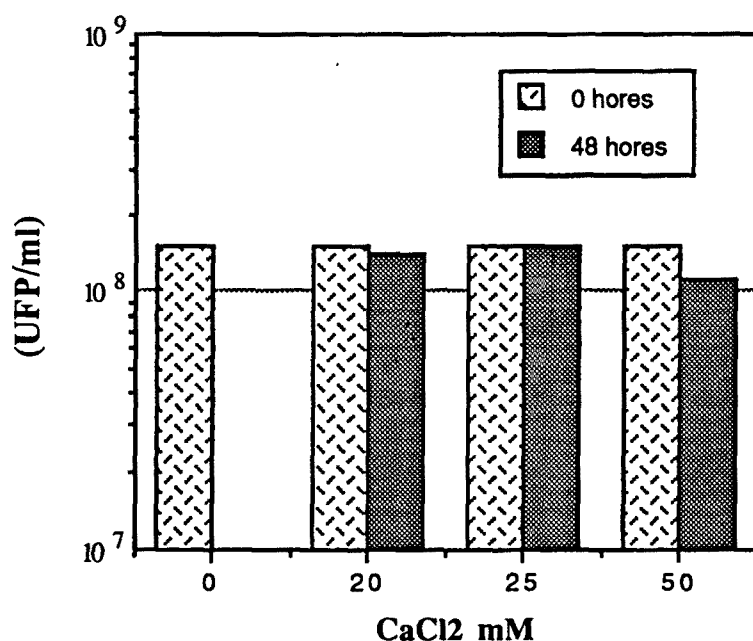


Figura 3.8: Recompte en UFP/ml de Φ D7.1 en medi sòlid a diferents concentracions de CaCl_2 .

3.2.4 - Importància de la fase de creixement de la soca hoste per a la infecció fàgica

L'estat fisiològic del bacteri varia al llarg del seu cicle biològic. Durant les diferents fases de creixement la cèl.lula passa d'un estat de latència, en el que no hi ha cap tipus de creixement, a un estat de màxima multiplicació, activitat metabòlica i formació de la paret cel.lular, per passar finalment a una fase sense cap activitat i en la que els embolcalls externs estan ben consolidats donant rigidesa i protecció a la cèl.lula. Aquests diferents estats provoquen en el bacteri respostes diferents als agents externs tals com els bacteriòfags.

La capacitat de provocar la lisi d'una soca sensible per un bacteriòfag és diferent, depenent de l'estat de creixement en què es troba el bacteri en el moment de la infecció, degut segurament a la formació de la paret cel.lular i a la capacitat de multiplicació del bacteri.

Dues soques de la col·lecció ICEB, la LOD004 i la D31.2 utilitzada com a soca indicadora, han estat infectades per Φ F93, aïllat directament del vi (veure apartat 3.8), al qual són sensibles. Cada una de les soques ha estat inoculada en 5 flascons de 20 ml de MRS, quatre seran inoculats amb el fag a diferents Abs_{600} i l'altre no serà infectat i servirà de control. El fag ha estat afegit als diferents flascons a una concentració final de $2 \cdot 10^8$ UFP/ml.

Les Abs_{600} a les quals s'ha fet la infecció sobre la soca LOD004 són: 0,19; 0,22; 0,29; 0,35 i per la soca D31.2: 0,25; 0,37; 0,49; 0,19. En tots els casos ens trobem al començament de la fase exponencial (Figura 3.9).

Si bé trobem que la fase de creixement té una clara influència en la lisi del bacteri, podem veure també que hi ha una variació entre les soques. La soca LOD004 pot arribar a sobreviure quan la infecció es fa a partir d'una Abs_{600} de 0,35, just al començament de la fase exponencial. Per la soca D31.2, molt sensible als fags, trobem que arriba a ser lisada a Abs_{600} relativament elevades, 0,49, que correspon a la meitat de la fase exponencial. En aquest cas la població és completament eliminada.

Quan multipliquem els bacteriòfags per augmentar la titulació del lisat, el que interessa és obtenir el màxim de partícules fàgiques, per tant les condicions òptimes seran les de permetre un creixement màxim dels bacteris, per donar després una lisi completa de la població. Quan la infecció es fa massa aviat els bacteris lisen completament sense multiplicar-se, la qual cosa fa que la titulació de fags augmenti poc.

Per veure si aquest efecte pot variar utilitzant per a la infecció un fag diferent, la soca D31.2 va ser infectada amb Φ LOD019, obtingut a partir de la inducció amb MC d'una soca lisogènica, i per tant un fag atemperat. La infecció es va fer a diferents Abs₆₀₀ durant el començament de la fase exponencial (Figura 3.10). En aquest cas el bacteri és lisat de manera menys ràpida, fins i tot, a Abs₆₀₀ baixes. Quan amb Φ F93 podem veure una lisi completa a una Abs₆₀₀ de 0,2, amb LOD019 la soca pot créixer encara un cert temps, encara que finalment la població bacteriana arribi a desaparèixer.

3.2.5 - Influència del pH en l'activitat lítica dels fags

El pH ha estat descrit per alguns autors com un factor que pot afectar l'activitat lítica dels fags dels bacteris làctics (Davies *et al.*, 1985; Heinick-Kling *et al.*, 1986). Es ben conegut que els pH baixos destrueixen els fags dels bacteris làctics (Sozzi *et al.*, 1978)

L'efecte del pH sobre l'activitat lítica dels fags ha estat estudiada sobre Φ DV 35.5. Tres sèries de dos tubs de 10 ml de MRS ajustats a tres pH diferents, pH 5.0; 4,5 i 3,6 han estat inoculats amb un cultiu de la soca sensible D 31.2. S'han deixat a 25°C durant 24 h i després s'han infectat amb els dos fags. Els resultats es mostren a la figura 3.11

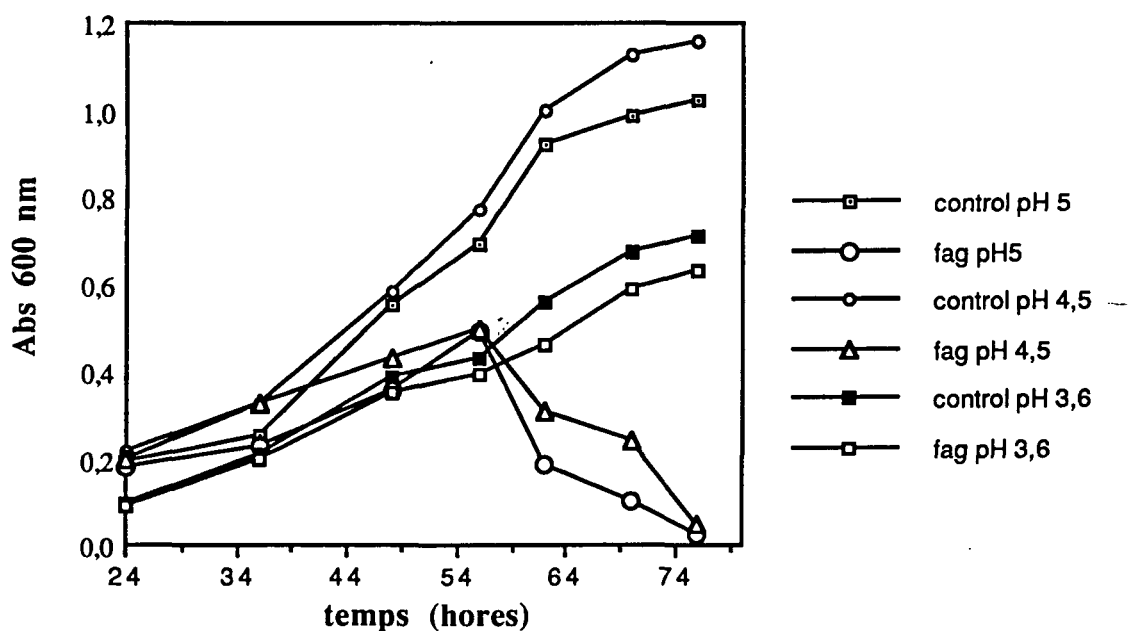


Figura 3.11: Efectes del pH en la lisi d'un cultiu bacterià causat per Φ DV44.4 en MRS a 25°C.

La capacitat de Φ DV44.4 per lisar a la soca indicadora és màxima quan el pH del medi està a 4,5. Si el pH augmenta fins a 5,0, la diferència observada és poc significativa; això vol dir que l'activitat lítica màxima del fag es troba a pH relativament elevats. Quan el pH disminueix, aquesta activitat lítica desapareix completament de manera que la soca indicadora no es veu inhibida en presència del fag, la seva capacitat per desenvolupar-se en el medi és més petita, però no és deguda a l'acció lítica del fag. Aquest fenomen podria ser degut a la modificació de les càrregues elèctriques de la superfície bacteriana produint un canvi d'afinitat entre el lloc d'adsorció i el fag.

Aquests resultats es contradiuen amb els resultats trobats per Heinick-Kling *et al.* (1986), els quals van observar una activitat lítica més elevada a mesura que el pH disminueix, contràriament Davis *et al.* (1985) van trobar que els pH baixos, de aproximadament de 3,5, són destructius per als bacteriòfags.

3.2.6 - Influència de la temperatura en la multiplicació dels fags

La temperatura és un factor important en el creixement dels bacteris, el que pot explicar una multiplicació difícil de la flora bacteriana. La temperatura òptima de creixement pels bacteris làctics del vi es troba entre 25-30 °C, encara que el creixement és possible entre 20-35 °C (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1975).

Per veure si la multiplicació fàgica varia a les diferents temperatures en les quals es troba *L. oenos* durant la FML es van provar dues soques, D31.2 i EFA24. Després d'incubació de 24h a 25°C cada una d'elles va ser infectada per tres fags, induïts de tres soques lisogèniques, Φ DV44.4, Φ DV35.5 i Φ DV40.4, en 10 ml de MRS i incubades a tres temperatures diferents: 19°C, 25°C i 30°C. Després de 48h, els cultius es van centrifugar i es va provar la presència de fags en el sobrenadant per la tècnica de la doble capa (Taula 3.3).

Taula 3.3: Nombre de fags en UFP/ml comptats en el moment de la infecció (t=0) a temperatura ambient i després de 48h d'incubació a tres temperatures diferents, i sobre dues soques sensibles, EFA24 i D31.2.

		EFA24		
		temps=48 h		
temps=0		19°C	25°C	30°C
Φ DV44.4	5.10 ⁷	7.10 ⁷	3.10 ⁸	2.10 ⁸
Φ DV35.5	7.10 ⁷	8,9.10 ⁷	3.10 ⁸	3.10 ⁸
Φ DV40.4	4.10 ⁷	5.10 ⁷	1.10 ⁸	9.10 ⁸

		D31.2		
		temps=48 h		
temps=0		19°C	25°C	30°C
Φ DV44.4	5.10 ⁷	4.10 ⁷	5,2.10 ⁸	5.10 ⁸
Φ DV35.5	7.10 ⁷	7.10 ⁷	2.10 ⁸	1,1.10 ⁸
Φ DV40.4	4.10 ⁷	5.10 ⁷	9.10 ⁷	9,3.10 ⁸

Les diferències que s'observen en la multiplicació entre 25 i 30°C són poc significatives. La multiplicació del fag està relacionada directament amb el creixement del bacteri i entre aquestes dues temperatures el creixement bacterià és molt semblant. Contràriament, a 19°C la multiplicació és quasi inexistent degut a la dificultat que tenen els bacteris a créixer.

3.2.7 - Discussió i conclusions

L'optimització de les condicions de cultiu dels bacteriòfags ens ha permès d'agilitzar i obtenir ràpidament el màxim de partícules fàgiques en la seva multiplicació.

Un dels problemes amb el qual ens hem trobat ha estat la dificultat de multiplicar els bacteriòfags. Les condicions òptimes de cultiu han fet augmentar el nombre de fags obtinguts, no obstant es molt difícil d'arribar a quantitats suficients per poder arribar a fer alguns experiments. Aquesta ha sigut una de les grans limitacions en el nostre treball, concretament en la part dedicada a l'estudi de la biologia molecular dels fags, per la qual, les quantitats de material genètic necessàries eren sempre superiors a les quantitats obtingudes, sobretot si tenim es compte que es tracta d'organismes extremadament petits.

Malgrat això, hem aconseguit multiplicar fàcilment, fins a quantitats no superiors a 10^{10} UFP/ml, tenint la certesa de que si no apareixen partícules fàgiques en un lisat no és a causa de les condicions de cultiu.

En definitiva, s'ha trobat que el millor moment per a poder infectar un bacteri és al començament de la fase exponencial per a tots els fags atenuats provats. La fase de latència i la fase de explosió es reconeixen per una disminució de fags en el medi; aquestes dues fases juntes duren al voltant de 8 hores. Després es pot començar a observar un clar augment de partícules fàgiques i per tant la multiplicació.

La presència d'ions Ca^{2+} en el medi és molt important per la penetració del material genètic del fag dins el bacteri, encara que podem veure que en medi líquid no es fa absolutament indispensable. L'absència de Ca^{2+} en el medi no pot doncs, impedir la infecció de la població bacteriana encara que si la pot disminuir. En medi sòlid la multiplicació és inexistent en absència de Ca^{2+} .

Pel que fa a la temperatura no s'observen grans diferències. La multiplicació del fag depen del creixement del cultiu bacterià per tant les temperatures que l'afavoreixen són les utilitzades per a l'obtenció dels lisats. Entre 25-30°C les diferències són mínimes donat que *L. oenos* creix bé en els dos casos. En aquest treball s'han incubat a 25°C per l'obtenció de lisats. Podem veure que a 19°C, els bacteris creixen més lentament i per tant no s'observa multiplicació dels fags.

Els pH baixos tenen un efecte inhibitor tant per al desenvolupament bacterià com per l'activitat lítica del fag. La sensibilitat en aquest cas és la mateixa pel fag i el seu hoste.

Aquestes condicions de multiplicació dels fags trobades com a òptimes per obtenir un màxim de biomassa bacteriana i en conseqüència un elevat nombre de fags, han permès treballar més fàcilment. No obstant, la dificultat de l'espècie *L. oenos* per a ser cultivada i la baixa capacitat infectiva dels deu fags induïts, no ens han permès obtenir grans quantitats de partícules fàgiques i per tant ens hem trobat limitats en aquest sentit per a alguns experiments com és el cas de l'obtenció de proteïnes de la càpside dels fags.

3.3 - RESISTENCIA DELS BACTERIS A LA INFECCIÓ **FÀGICA**

En aquesta part del treball s'ha volgut fer una aproximació al coneixement del tipus de resistència presenten les soques de la col.lecció. En primer lloc s'ha tractat d'analitzar l'absència d'adsorció com a mecanisme de resistència. A continuació s'ha intentat fer una selecció de mutants que presentin resistència a una sèrie de fags aïllats directament del vi.

3.3.1 - Adsorció dels bacteriòfags

Per tal que el genoma del fag pugui entrar en el bacteri és necessari un contacte amb la superfície cel.lular, aquesta etapa és l'adsorció i constitueix la primera etapa en tota interacció fag-bacteri, després continua la penetració del genoma fàgic.

El contacte entre un fag i un bacteri sensible comporta el seu lligam degut a una atracció electrostàtica entre les càrregues elèctriques de les proteïnes de la càpside i les caregues complementàries dels receptors específics repartits en la superfície de la cèl.lula. Aquest fenomen és conegut amb el nom d'adsorció. Els receptors dels fags estan constituïts de lipopolisacarids o bé de glicoproteïnes i es localitzen en la paret cel.lular.

La adsorció dels fags per part dels bacteris és la primera barrera a superar en el cicle de multiplicació del fag. Alguns bacteris són resistents als fags perquè no posseeixen els receptors.

En aquest treball hem volgut determinar com es produeix l'adsorció en les soques de la col.lecció i la influència que té en la resistència als fags.

En base al mètode descrit en els materials i mètodes s'ha procedit de la següent manera:

En primer lloc es va voler determinar el temps necessari perquè es produís l'adsorció. A tres tubs contenint 0,1 ml d'un cultiu de bacteris de 48 hores es van afegir 0,1 ml de una suspensió de fags en una proporció de fags/bacteris = 0,2. Cada un dels tubs s'incuba a

25°C durant 5, 15 i 30 minuts respectivament, després es filtra a través d'una membrana de 0,45 µm i es compten els fags pel mètode de la doble capa.

Els fags utilitzats van ser Φ DV41.1, Φ DV44.4, Φ T92.2 i la soca indicadora D31.2. Després de fer els comptatges vam trobar els resultats que es mostren a la Figura 3.12.

Durant els primers 5 minuts l'adsorció és ja molt elevada, entre 93% i 96%, per a dos dels fags. Per a Φ DV44.4 no s'ha pogut determinar. Al cap de 15 minuts, la quantitat de fags adsorbits ha augmentat per quedar estabilitzada en aquest punt, cosa que es veu perquè la diferència entre els 15 minuts i els 30 minuts és inexistent.

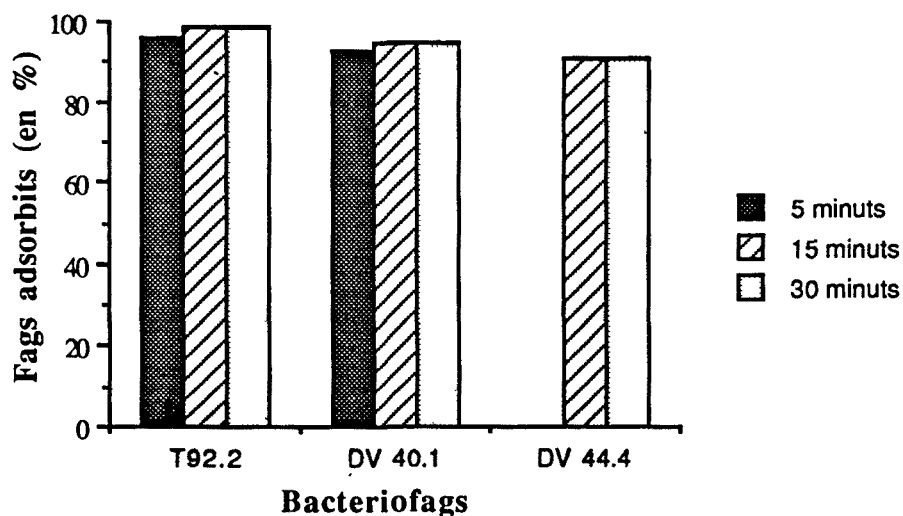


Figura 3.12: Percentatge d'adsorció de tres fags, Φ T92.2, Φ DV40.1 i Φ DV44.4 sobre la soca indicatriu D31.2 a diferents temps, 5, 15 i 30 minuts i a 25°C.

L'adsorció varia una mica segons els fags que infecta el bacteri però en els tres casos veiem que al cap de 15 minuts, s'arriba al màxim de fags adsorbits. En els comptatges de fags fets en el nostre treball utilitzarem a partir d'ara 15-20 minuts com a temps d'adsorció.

La temperatura amb la que normalment treballem és de 25°C però hem pogut verificar que l'adsorció es pot donar també a 4°C. Les suspensions de fags obtingudes a partir de la infecció fàgica d'un cultiu, són guardades a 4°C. Hem pogut constatar que en aquests lisats, quan es guarden sense filtrar, és a dir en presència de bacteris, la titulació de fags disminueix degut a l'adsorció. Quan es guarda el lisat filtrat la titulació es manté, la qual cosa vol dir que l'adsorció és independent de la temperatura.

3.3.2 - Absència d'adsorció com a mecanisme de resistència

S'intentarà veure si l'absència d'adsorció és present en algunes de les nostres soques com a mecanisme de resistència. Vam comparar en primer lloc l'adsorció que presenta la soca indicadora D31.2, sensible a la majoria de fags, i la soca LOD023 resistent al fag Φ LOD004, el qual volem provar per veure si la resistència era deguda a la manca d'adsorció.

Utilitzant el protocol descrit en l'apartat anterior, es va observar que els percentatges d'adsorció són diferents per a les dues soques:

D31.2.....	87%
LOD023.....	23%

Veiem que l'adsorció és elevada en la soca indicadora i molt baixa en la soca resistent. Per aquest fag la resistència de la soca LOD023 ve donada per l'absència d'adsorció. El petit nombre de fags adsorbits són després destruïts per un altre sistema de resistència dels bacteris.

En altres bacteris la resistència ve donada per mecanismes que no són l'absència d'adsorció. Per verificar que podien existir altres procediments de resistència en les nostres soques vam determinar l'adsorció dels quatre fags Φ DV 42.7, Φ DA 27.4, Φ DV 40.8 i Φ DV 39.8, sobre la soca LOD004 la qual els hi és resistent.

Es va determinar si hi havia adsorció d'aquests fags per part de la soca LOD004 i es va comparar el que pasava amb la soca D31.2, de la qual es coneix que és sensible als fags utilitzats. La figura 3.13 ens mostra els resultats obtinguts. El nombre de partícules fàgiques adsorbides de cada un dels diferents fags varia i això és degut a què la titulació dels lisats utilitzats durant l'experiment era diferent per als diferents fags. El que ens interessa però d'aquests resultats és la comparació de l'adsorció de cada un dels fags entre la soca LOD004 i la soca indicatriu D 31.2.

Les diferències en el nombre de partícules fàgiques adsorbides entre les dues soques són semblants per tots els fags la qual cosa vol dir que la soca LOD004 és capaç d'adsorbir els fags tot i que no permet la seva multiplicació.

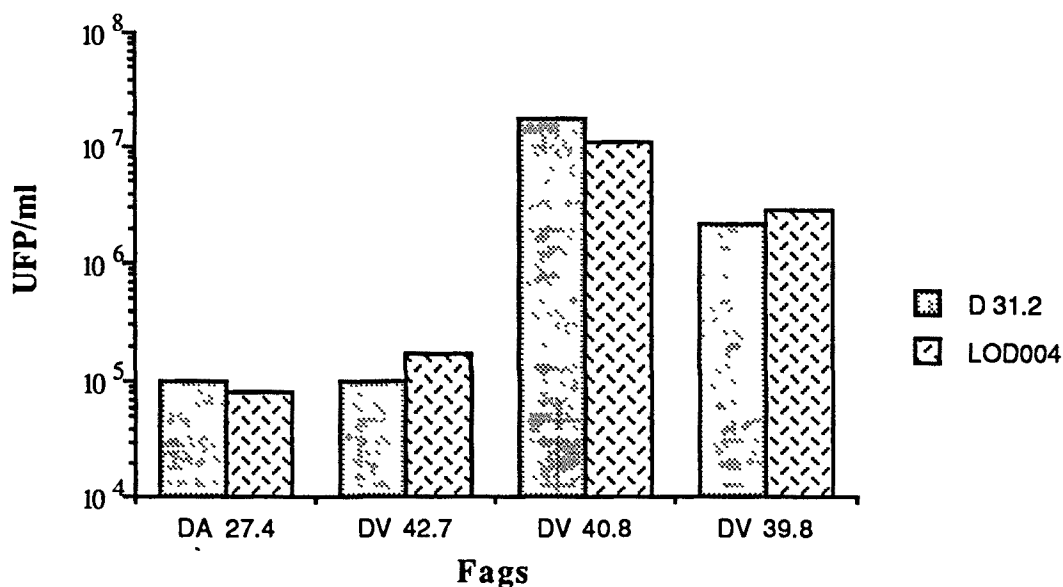


Figura 3.13: Nombre de partícules fàgiques adsorbides sobre dues soques diferents D31.2 i LOD004 dels fags Φ DA 27.4, Φ DV 42.7, Φ DV 40.8 i Φ DV 39.8.

Les diferències en l'adsorció que s'observen entre les dues soques per a cada un dels fags podria ser deguda a una variació en el nombre de receptors.

Quan calculem el percentatge d'adsorció de cada un dels fags (taula 3.4) sobre les dues soques veiem que, malgrat que hi ha una certa diferència deguda segurament a les característiques de la superfície cel·lular de les dues soques, podem dir que en els dos casos hi ha adsorció dels fags i que si els comparem amb els percentatges obtinguts en l'apartat anterior entre la soca D 31.2 i la soca LOD023 en aquest últim cas les diferències són més grans.

Podem dir doncs que la resistència en la soca LOD004 no és deguda a l'absència d'adsorció però no podem determinar de moment si es tracta d'un mecanisme de restricció/modificació o d'un tipus d'infecció abortiva.

Taula 3.4: Percentatges d'adsorció de quatre fags sobre les soques D 31.2 i LOD004.

	D 31.2	LOD004
Φ DA 27.4	71%	57%
Φ DV 42.7	52%	89%
Φ DV 40.8	94%	57%
Φ DV 39.8	75%	98%

3.3.3 - Temptativa de selecció d'una soca resistent

Un dels sistemes tradicionals utilitzats en la indústria làctica per seleccionar soques resistents als fags ha estat la d'incubar els cultius bacterians utilitzats com a estarters en presència d'un medi que contingui fags, la qual cosa actua de pressió selectiva per afavorir la persistència dels bacteris resistents. Les soques seleccionades eren guardades per la inoculació dels fermentadors.

Nosaltres hem volgut veure si aquest es pot considerar com un bon mètode o bé si aquesta resistència de les soques seleccionades és un caracter que es perd en el temps.

Per això 5 fags aïllats de vins de diferents orígens (F2, F3, F4, F5, F6) van ser inoculats a cinc cultius de 10 ml de la soca D 31.2 sensible a tots ells.

Al cap de 48 hores d'incubació a 25°C es va poder observar un lisat en el tub inoculat comparant-lo amb un tub control sense fags. Els lisats van ser centrifugats durant 10 minuts a 12000 xg i es va recuperar el *pellet* en el qual s'hi trobaven els bacteris que haurien resistit a la infecció, inoculant-lo a 1 ml de MRS. Aquest cultiu es va incubar durant 24 hores a 25°C i va ser utilitzat com a tapís sobre medi sòlid per verificar, mitjançant el test de la gota, la seva resistència als cinc fags inicials. Els cinc cultius es van denominar RF2, RF3, RF4, RF5, RF6, depenent de quin va ser el fag amb el qual havia estat infectat.

Per a RF2, RF5 i RF6 es va observar que presentaven resistència per a tots els cinc fags. En el cas de RF3 i RF4 es van observar plaques de lisi per tot el tapis bacterià, degut segurament, a la inducció espontània del fag integrat en el cromosoma bacterià. El treball es va continuar només amb els tres cultius resistents.

Cada un d'aquests tres cultius van ser inoculats en dos tubs de 10 ml de MRS. Un dels tubs va ser sembrat sense la presència del fag i l'altre amb la presència continuada del fag. Per això, en el moment en que s'inoculaven els bacteris, s'inoculava també amb una quantitat elevada de fags, 10^7 UFP/ml (superior al dels bacteris). Els resembrats es feien cada 48 hores, després dels quals ja podíem saber si es produïa o no un lisat.

Després del segon sembrat, el cultiu RF2, en el qual s'inoculaven permanentment els fags, presentava una disminució del creixement, apreciable a ull nu comparat amb el tub control, degut sens dubte a l'acció lítica dels fags. Per als cultius RF5 i RF6 el creixement va ser similar al del tub control.

Després del sisè sembrat, el cultiu RF2 incubat amb la presència de fags presentava un lisat quasi complet. Quan es va infectar el tub que s'havia sembrat sense la presència de fags es va poder observar, al cap de 48 hores, que el fag havia lisat tot el cultiu bacterià. Per altra banda els cultius RT5 i RT6 continuen creixent en presència de fags comparats amb el tub control. Quan s'infecten aquests dos cultius control amb els seus fags respectius, s'observa una lleugera disminució de la població respecte a un tub control sense infectar.

Després del vuitè sembrat, el cultiu RT2 en presència de fags va presentar un creixement igual al del tub control. Contràriament, en els cultius RT5 i RT6 la presència de fags va provocar una disminució del creixement respecte del control.

Després de l'onzè repicatge, el cultiu RT2 i RT6 creixien igual que en el tub control i per tant no van ser afectats per la presència de fags. En canvi, en el cultiu RT5, es va poder observar un lisat quan va ser infectat amb el seu fag corresponent.

3.3.4 - Dicussió i conclusions

L'adsorció és el pas previ a la penetració dels fags dins la cèl.lula i per tant imprescindible per al procés d'infecció. Es tracta d'un procés relativament ràpid comparat al cicle de multiplicació. Per a les nostres soques s'ha vist que al cap de 15 minuts, la major part dels fags s'han adsorbit i que el percentatge d'adsorció es manté igual 30 minuts més tard. A partir d'aquest moment i durant tot el nostre treball utilitzarem 15 min com a temps d'adsorció.

La absència d'adsorció pot ser, doncs, causa de resistència als fags, com hem pogut veure en el cas de la soca LOD023, la qual presenta un percentatge molt baix respecte a la soca indicadora. Aquest no és però l'únic mecanisme de resistència ja que podem veure que els fags que s'han provat sobre la soca D 31.2 (indicadora) i la soca LOD004 que és resistent, s'adsorbeixen en quantitats molt semblants sobre les dues soques, mostrant així que la resistència ve donada per un altre mecanisme que en aquest moment no podem definir.

S'adsorbeixen en quantitats elevades, superiors en tots els casos al 50%. Encara que l'adsorció no és completa no és pot considerar en aquest cas com a mecanisme de resistència donat que en alguns casos aquest percentatge és igual al de la soca indicadora la qual presenta sensibilitat.

En aquests quatre casos la resistència ve donada per un dels altres dos mecanismes descrits com són el sistema de restricció/modificació o bé per infecció abortiva, cosa que, en aquests moments no podem verificar.

La possibilitat de que una soca sensible esdevingui resistent seria molt interessant de cara a la seva aplicació en les soques industrials. Algunes d'aquestes són sensibles als fags però presenten característiques molt apreciades que les fan insubstituïbles per d'altres sòques. Per això s'ha volgut verificar si es podien seleccionar mutants resistents d'una soca determinada i si aquest caràcter és estable; hem vist però que malgrat que hem pogut seleccionar clons resistents, aquests perden la seva resistència al poc temps. Pensem que l'obtenció de soques resistents ha de passar per l'intervenció de l'enginyeria genètica.



**ESTUDI DE LA LISOGÈNIA DE *LEUCONOSTOC OENOS* I
INCIDÈNCIA DELS BACTERIÒFAGS SOBRE LA
FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA DEL VI.**

Memòria presentada per
MONTSERRAT POBLET ICART
per optar al grau de Doctora en Ciències Químiques

Tarragona, Setembre de 1994

3.4 - CARACTERIZACIÓ I COMPARACIÓ DELS FAGS DE LEUCONOSTOC OENOS

Una vegada optimitzades les condicions de multiplicació es va poder començar a treballar amb tècniques de biologia molecular per tal de caracteritzar millor els fags i poder-los diferenciar.

Aquestes tècniques utilitzen bàsicament el DNA dels organismes per explicar les diferències entre ells i com a eina per a la detecció d'homologies, basada en la capacitat d'hibridació entre dos DNA idèntics.

3.4.1 - Diferenciació dels bacteriòfags per l'estudi dels perfils de restricció del seu DNA

L'espectre d'hostes d'un fag el caracteritza respecte d'un altre, però la identificació es fa difícil quan el nombre de soques sobre les que es prova no és molt gran degut a que podem obtenir espectres d'hoste iguals en molts casos. La diferenciació dels bacteriòfags tenint compte de les seves aptituds fisiològiques respecte a la bacteria hoste ens ha servit fins ara com a mètode de diferenciació.

L'aplicació de les tècniques de biologia molecular ens permetran diferenciar els diferents fags per l'estudi del seu DNA. Jimeno *et al.* (1989) van diferenciar les espècies i les soques de bacteris làctics utilitzats a la indústria làctica pels perfils de restricció del seu DNA. Fremaux (1990) va estudiar els perfils de restricció del DNA cromosòmic de *L. oenos* per posar en evidència les diferències entre elles, però, el mètode presenta algunes dificultats degut a que la quantitat de DNA és molt gran i no es poden observar bandes definides, sinó un gran *smear* (gran taca continua). Les petites diferències que es poden observar són degudes moltes vegades a digestions parcials del DNA, la qual cosa no ens ajuda gens en la diferenciació. La separació de soques de bacteris és per tant impossible per a l'estudi del perfil de restricció del DNA cromosòmic. No obstant, per als bacteriòfags no tenim el problema de treballar amb un gran genoma, el DNA fàgic és petit comparat al d'un bacteri i per tant el nombre de fragments que es poden esperar

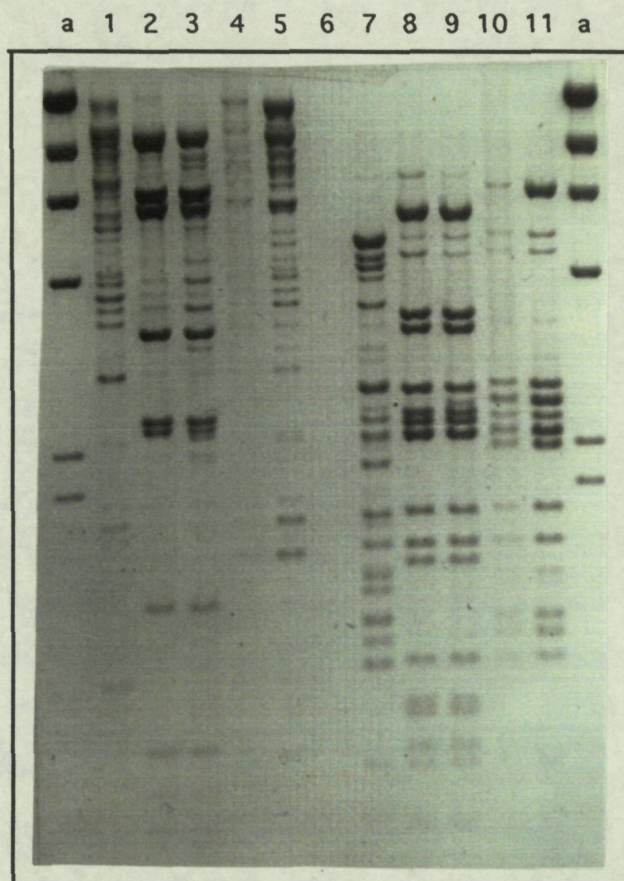


Figura 3.12: Resultats de les digestions amb *EcoRI* i *HindIII* dels següents fags:

pista 1: T692, pista 2: DV41.1, pista 3: DV13.4, pista 4: DV43.1, pista 5: DV44.4
digerits per *EcoRI*. Les pistes de la 6 a la 10 són els mateixos fags digerits per
HindIII.

a: marcador de pes molecular λ *HindIII*.

Resultats: caracterització dels bacteriòfags

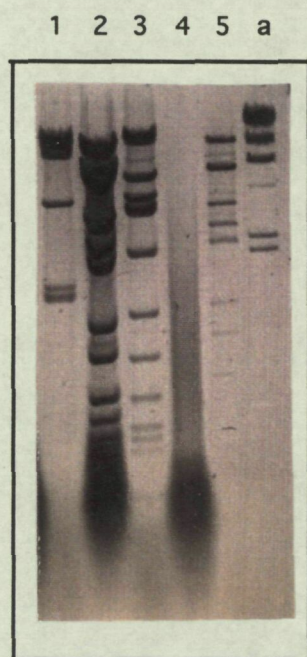


Figura 3.13: Resultats de les digestions amb *EcoRI* dels següents fags: pista 1: D7.1, 2:DA39.3, 3: DV35.5, 4: DV40.4.
a: marcador de pes molecular λ *Hind* III.



Figura 3.14 : Resultats de les digestions amb *EcoRI* dels següents fags: pista 1: DA27.4. 2:DV42.7, 3: LOD004. Els dos primers fags no es digereixen amb aquest enzim.
a: marcador de pes molecular λ *Hind*III.

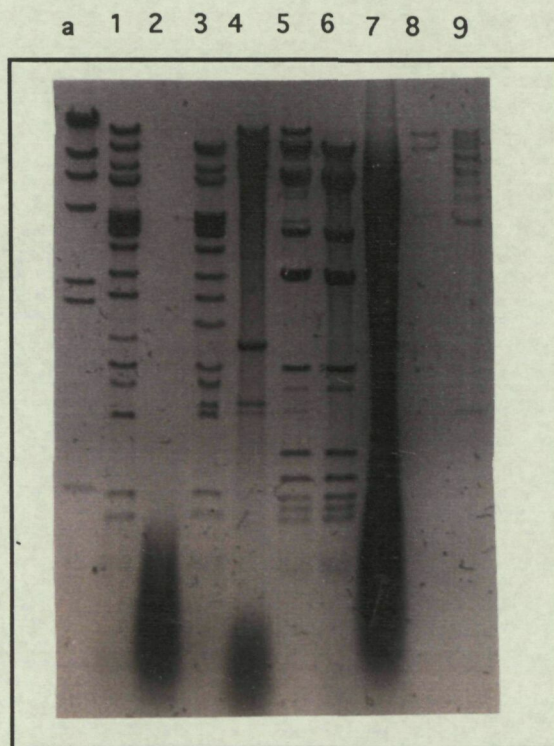


Figura 3.15 : Resultats de les digestions amb *EcoRI* dels següents fags: pista 1 i 3:
LOD019, pista 5 i 6:LOD017, pista 9: LOD021. les altres pistes mostren el DNA
degradat.
a: marcador de pes molecular λ *HindIII*.

després d'una digestió no ha de ser molt gran, i per això es va decidir de provar aquest sistema per la diferenciació.

A les figures 3.12, 3.13, 3.14, 3.15 es mostren els perfils de restricció d'alguns dels fags de la col·lecció, digerits per *EcoRI* i *Hind III*. Com podem veure, hi han fags que no s'han digerit bé quedant el DNA completament degradat. Els DNA que s'han digerit correctament ens permeten caracteritzar els fags. Els fragments de restricció són diferents per als diferents fags permetent així la seva diferenciació.

Els resultats ens mostren que els fags integrats en els bacteris lisogènics poden ser diferents. Aquestes diferències són sovint menys evidents quan es fa l'espectre d'hoste de cada un d'ells i per això cal recórrer a l'anàlisi del DNA per poder-los diferenciar.

Si comparem l'espectre d'hoste dels fags Φ DV43.1, Φ DV35.5 i Φ DV40.4, veiem que és el mateix, no obstant, el seu perfil de restricció ens mostra que es tracta de fags diferents. (Taula 3.5).

3.4.2 - Determinació de la mida del DNA fàgic

Després de la digestió del DNA fàgic per enzims de restricció obtenim una sèrie de fragments de diferent pes molecular (PM). La distància recorreguda per les molècules lineals de DNA dúplex durant una electroforesi en gel d'agarosa, és inversament proporcional al \log_{10} del seu pes molecular (Helling *et al.*, 1974).

Per calcular la mida en nombre de parells de bases (pb) del DNA d'un fag determinat es digereix per un enzim de restricció i es fa migrar en un gel d'agarosa conjuntament amb el DNA del fag λ digerit per l'enzim *Hind III* el qual ens serveix de marcador de talla dels fragments de DNA. La talla dels diferents fragments de λ i esta donada en pb: (23130 pb, 9416 pb, 6557 pb, 4361 pb, 2322 pb, 2027 pb, 564 pb). El marcador ens permet que mesurant la distància de migració d'aquestes bandes sobre el gel, podem calcular una recta de regressió. Per obtenir una recta cal desestimar el primer punt corresponent a 23130 pb.

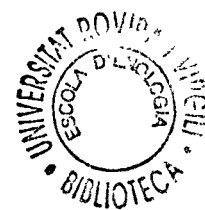
Sobre aquesta recta podem estimar la mida dels DNA dels diferents fags que s'hagin fet correr en un mateix gel d'agarosa. Només cal mesurar la distància de migració respecte de λ i extrapolar sobre la recta per conèixer la mida de cada una de les bandes. La suma de totes ens dóna la mida total del DNA del fag.

Taula 3.5 :Espectre d'hoste de tres fags Φ DV43.1, Φ DV35.5 i Φ DV40.4 fet amb 15 soques de la col.lecció de bacteris.

	DV	D	EFA	DA	DV	DA	DA	DV	DA	DV	DA	DV	DA	DV	DA	DV	DA	D	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD		
	29.2	31.2	24	2.5	42.9	47.6	43.3	39.3	004	023	019	017	7.1	013	021													
Φ DV43.1	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Φ DV35.5	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Φ DV40.4	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Taula 3.6: Mida d'alguns dels DNA dels bacteriòfags calculats a partir de les digestions que es mostren en les figures 3.12 a 3.15.

Fags	Mida (kb)
Φ DV41.1	66
Φ DV44.4	52,44
Φ LOD019	52
Φ LOD017	35
Φ LOD021	57,5
Φ D7.1	23
Φ DV39.3	25
Φ DV35.5	30
Φ DV40.4	28



Després de calcular la mida d'alguns dels DNA dels fags de utilitzats s'ha comprovat que és variable. Cal tenir en compte que el càlcul fet per aquest mètode es una estimació i per tant comporta un cert error. Les mides mesurades es troben entre 20 i 60 kb.

El problema més gran que ens hem trobat per treballar amb tècniques de biologia molecular per a l'estudi dels fags és l'obtenció del seu DNA. Els bacteriòfags contenen una quantitat molt petita de material genètic, com hem vist oscil.la entre 30-60 kb, depenent de cada un dels fags. Si prenem un fag amb un DNA d'una mida de 40 kb i el multipliquem dins 1 litre de medi de cultiu, normalment obtindrem un lisat a 10^8 fags/ml. Si calculem la quantitat de DNA fàgic que podem esperar d'aquest lisat obtindriem:

$$10^{11} \text{ fags/l} \times 40 \cdot 10^3 \text{ pb} \times 660 \text{ daltons/pb} / 6 \cdot 10^{23} \text{ molec/mol} = 4 \mu\text{g DNA}$$

Aquesta quantitat esperada, normalment es redueix a la meitat, degut segurament al procés de manipulació. En cada un dels rentats i precipitacions es perd una certa quantitat.

Per altra banda, quan fem les extraccions d'un gran nombre de fags diferents, partim de 200 ml de lisat la qual cosa redueix molt la quantitat de DNA recuperada però les condicions de treball no ens permetien manipular gaire sovint grans volums de cultius.

Aquesta ha estat una gran limitació durant tot el desenvolupament del nostre treball i moltes vegades la causa per la qual no s'ha pogut aprofundir més en el treball.

3.4.3 - Detecció dels bacteriòfags de *L. oenos* per hibridació entre els seus DNA

Com hem pogut veure en els resultats obtinguts en l'apartat 3.1, el test de la MC presenta alguns problemes per a la seva utilització a gran escala. L'obtenció del DNA fàgic ens permetrà d'utilitzar tècniques de biologia molecular per detectar la presència de fags, tant en el medi com dels profags integrats en el cromosoma bacterià.

El mètode de identificació de microorganismes per anàlisi directa del genoma basats en la hibridació de sondes específiques amb el DNA cromosòmic, ha estat ben desenvolupat per Kurita *et al.* (1986). En el nostre treball aquests mètodes han estat adaptats per a la detecció dels fags, per això el primer pas és la construcció de la sonda i la verificació de què ens permet detectar el DNA fàgic.

1) Construcció de la sonda:

El DNA fàgic s'ha extret a partir d'un lisat obtingut d'1 litre de cultiu. El fag Φ DV35.5 ha estat multiplicat sobre la soca D31.2. El DNA és quantificat i posteriorment 200 ng han estat marcats pel mètode de la digoxigenina.

El temps de marcatge, és a dir, el temps necessari per a la incorporació al DNA fàgic dels nucleòtids marcats per la digoxigenina, va ser el primer pas a canviar respecte del mètode proposat per Boehringer en el kit de marcatge. En les primeres tentatives es van provar temps entre 2 - 4 hores com per al marcatge del DNA cromosòmic sense obtenir bons resultats. Quan el temps de marcatge es va augmentar a 8 hores el DNA es va marcar sense cap problema.

2) Condicions d'hibridació

Les primeres hibridacions es van fer sobre el DNA de dos fags, Φ D7.1 i Φ DV 35.5. La sonda es va obtenir pel marcatge del DNA d'aquests fags, utilitzant el mètode de la digoxigenina. Els DNA en solució, van ser col·locats sobre una membrana de niló en quantitats diferents: 100, 50, 10, 5, 1 ng i fixats amb 0,4 N NaOH (fixació en *dot-blot*). Les condicions d'hibridació i els rentats posteriors es poden considerar d'una astringència considerable (2x SSC). Això vol dir que són condicions poc favorables per a la hibridació. Quan en aquestes condicions s'obtenen DNA que hibriden voldrà dir que es tracta de DNA homòlegs.

Pel que fa a la quantitat de sonda a utilitzar, com que en principi, no sabem quina seria la quantitat òptima, es va utilitzar una forta concentració per assegurar la hibridació.

40 ng/ml de solució d'hibridació, quantitat que representa la mitat del que s'utilitza en les hibridacions entre DNA bacterians. Els resultats mostren senyal d'hibridació per totes les concentracions de DNA deposades, la sonda pot detectar fins a 1 ng de DNA fàgic. Contràriament, la quantitat de sonda es massa elevada i això provoca que els filtres presentin un color de fons amb molt de color el que fa que les senyals d'hibridació siguin mes febles.

Quan reduïm la concentració de la sonda a 8 - 10 ng/ml de solució d'hibridació, la senyal sobre el filtre va ser més nítida, destacant millor sobre el fons blanc. La concentració de la sonda és molt important per obtenir bons resultats. El problema està sovint en l'excés de sonda, ja que quan és massa elevada es fixa de forma inespecífica sobre el filtre i els resultats són incapaços d'eliminar-la donant després la coloració de fons.

Una vegada optimitzades les condicions de marcatge i hibridació es van construir 6 sondes a partir dels DNA de 6 fags diferents, icada una d'elles va ser hibridada amb els DNA del sis fags. La hibridació es va fer en *dot-blot*, la quantitat de DNA col.locada ha sigut de 100 ng per assegurar un bon senyal d'hibridació.

Els fags utilitzats van ser: Φ DV40.4, Φ DV44.4, Φ DV 35.5, Φ DV 41.1, Φ DA 39.3 i Φ LOD019.

Aquests resultats obtinguts en *dot blot* van demostrar que en tots els casos s'obtingui senyal d'hibridació. Els DNA hibriden tots entre ells fins i tot quan no són completament iguals. Aquestes diferències només les podem apreciar observant el perfil de restricció i no afecten gens a la hibridació del DNA total dels fags. No podem assegurar que els DNA hibridin completament entre ells, les diferències que veiem entre ells en els perfils de restricció es tradueixen com a diferències en la seqüència de nucleòtids. L'única manera de verificar-ho és hibridant la sonda amb un altre DNA fàgic digerit per un enzim de restricció.

Podem concloure doncs que les diferències no són suficientment importants i que hi ha una gran part de DNA homòleg entre ells, la qual cosa ens permetrà d'utilitzar qualsevol DNA fàgic com a sonda.

Altres DNA de fags van ser provats per verificar que obteníem en tots els casos hibridació. El test es va fer en *dot-blot* i els resultats són a la taula 3.7:

El fet que tots els DNAs dels fags provats hibridin amb les sondes ens dóna un gran avantatge pel fet que podem utilitzar qualsevol fag per construir una sonda i detectar així el DNA fàgic encara que no sigui completament idèntic. En realitat, les diferències entre els fags dels bacteris làctics no són molt grans, això ens permet una detecció fàcil quan hibridem els DNA entre ells.

Els fags de *L. oenos* es poden considerar com a molt pròxims entre ells des del punt de vista genètic. El nombre de fags provats és limitat però el seu origen geogràfic és diferent, provinent de vins de diferents països d'Europa.

A la bibliografia (Arendt *et al.*, 1991) es descriuen casos de fags de *L. oenos* que no hibriden entre ells, però en el nostre cas això no s'ha pogut verificar.

Aquest fet ha permès utilitzar qualsevol DNA fàgic de la col.lecció en les hibridacions en *dot-blot* per a la detecció de fags.

Taula 3.7: Resultats de les hibridacions en *dot blot* entre el DNA de 14 fags de la col.lecció amb 6 sondes.

	Sondes					
	DV40.4	DV44.4	DV35.5	DV43.1	DA39.3	LOD019
ΦDV40.4	+	+	+	+	+	+
ΦDV44.4	+	+	+	+	+	+
ΦDV35.5	+	+	+	+	+	+
ΦDV43.1	+	+	+	+	+	+
ΦDA39.3	+	+	+	+	+	+
ΦD7.1	+	+	+	nd	nd	nd
ΦLOD021	+	+	nd	nd	+	+
ΦLOD013	+	+	+	nd	+	+
ΦLOD004	+	+	+	nd	+	+
ΦLOD019	+	+	+	nd	+	+
ΦLOD015	+	+	+	+	+	+
ΦLOD014	+	+	+	+	+	+
ΦBo	+	+	nd	nd	nd	nd
ΦDV29.2	+	+	+	+	nd	nd

+: senyal de hibridació

nd: resultat no determinat

3.4.4 - Hibridació del DNA d'un fag de *Lactobacillus plantarum* amb el DNA de diferents fags de *L. oenos*

El DNA del fag de *Lactobacillus plantarum* va ser extret a partir d'un cultiu d'1 litre tractat amb la MC. El fag no va poder ser multiplicat degut a la manca de soca indicadora per aquesta espècie. No obstant, *Lb. plantarum* creix fàcilment donant una gran

quantitat de biomassa la qual cosa fa que haguem obtingut una quantitat suficient de DNA fàgic per fer una sonda només amb la inducció amb MC. La quantitat obtinguda de DNA va ser de 125 ng/ μ l en un volum de 10 μ l.

La sonda es va obtenir mitjançant el marcatge del DNA fàgic pel mètode de la digoxigenina. Les condicions d'hibridació i dels rentats per eliminar la sonda poden ser considerades d'una astringència elevada:

solució d'hibridació: 5x SSC

rentats després hibridació: 2x SSC a temperatura ambient i 0,1x SSC a 65°C.

Aquestes condicions d'astringència van ser triades perquè d'aquesta manera ens asseguràvem que si hi havia senyal d'hibridació era perquè realment hi han regions del DNA homòlogues, evitant així hibridacions entre regions pròximes però no idèntiques.

El DNA de 6 fags de la col.lecció, Φ DV44.4, Φ DV35.5, Φ DV41.1, Φ LOD 004, Φ LOD021 i Φ LOD017 van ser col·locats sobre membrana de niló en *dot-blot*. La quantitat deposada va ser de 100 ng de DNA, i la concentració de la sonda de 10 ng en 2ml de solució d'hibridació.

Després del revelat de la membrana no es va trobar cap senyal d'hibridació.

Com que el que volíem veure era si el fag d'una altra espècie era suficientment diferent per no confondre'l amb els fags de *L. oenos*, els resultats mostren que quan es tracta d'una altra espècie els DNA no hibriden mentre que contràriament tots els fags de *L. oenos* hibriden entre ells.

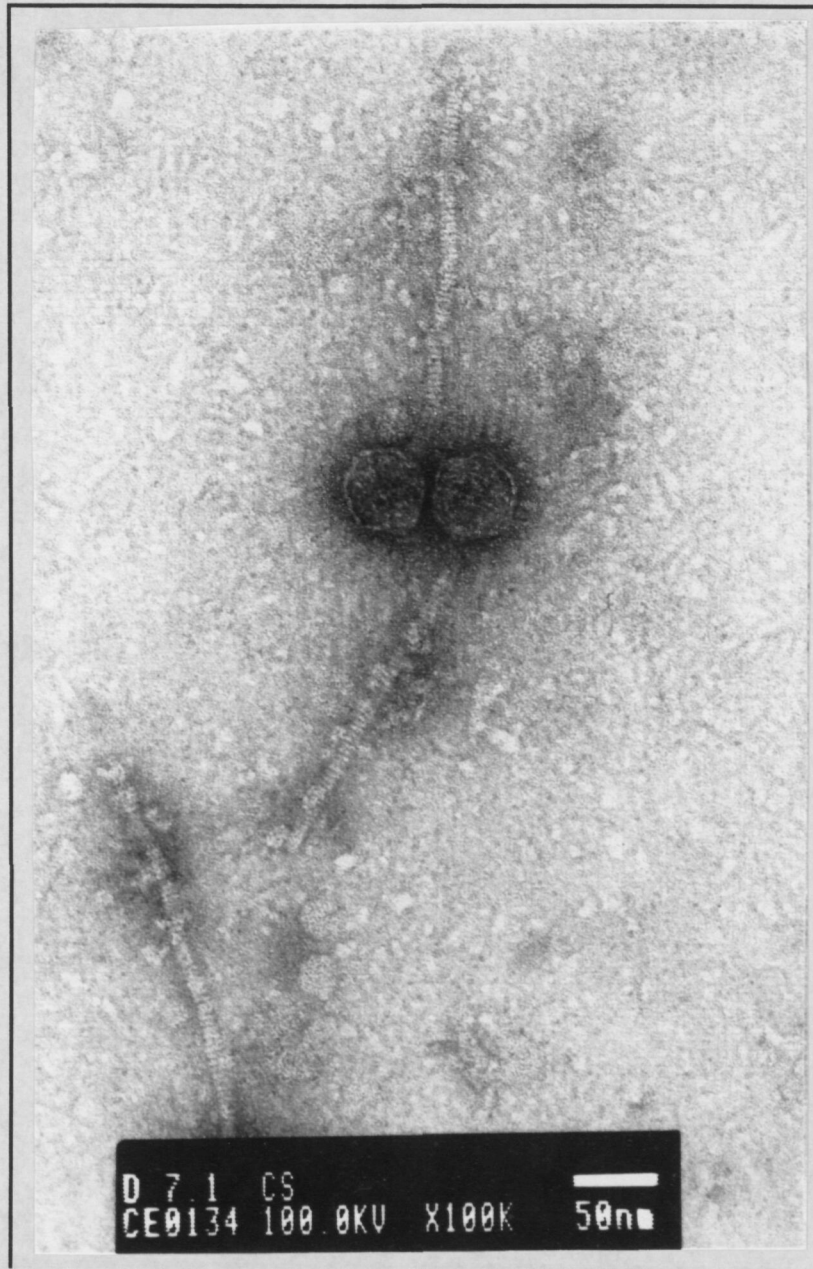
3.4.5 - Observació dels bacteriòfags al microscopi electrònic

Els fags obtinguts a partir d'1 litre de lisat a una concentració d'entre 10^9 - 10^{10} UFP/ml han estat precipitats amb PEG 6000 (Yamamoto *et al.*, 1970) i posteriorment purificats en gradient de CsCl.

El volum obtingut es va dialitzar per eliminar el CsCl. Aquesta suspensió de fags es la que es va utilitzar per a l'observació al microscopi electrònic. El tractament previ a l'observació està descrit en els Materials i Mètodes.

L'observació es va fer per la tècnica de la coloració negativa, en aquest cas el colorant (acetat d'uranil) no reacciona amb el fag, únicament el recobreix apareixent a la fotografia en blanc i envoltat d'un fons negre.

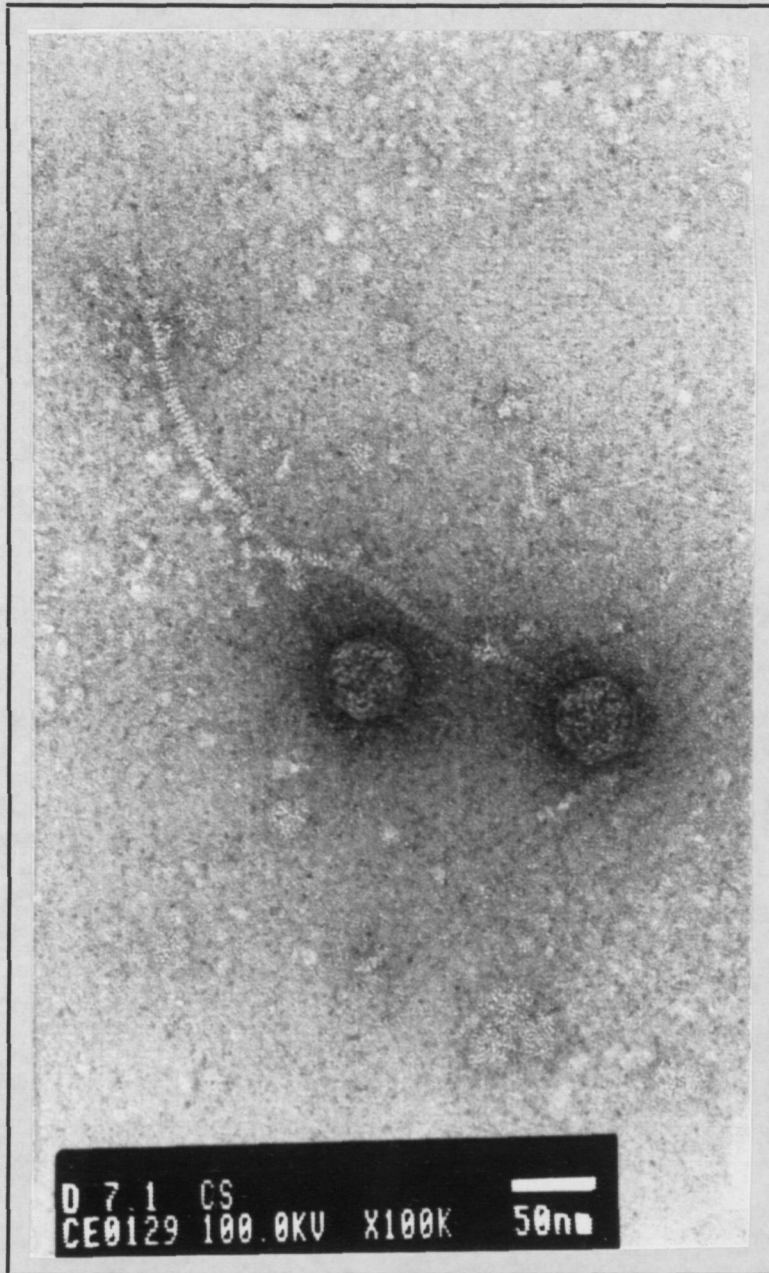
La morfologia del fag Φ D7.1 es mostra a la figura 3.16:



(a)

Figura 3.16: Fotografies (a i b) del fag Φ D 7.1 observats al microscòpi electrònic per la tècnica de coloració negativa amb acetat d'uranil. Podem observar bé la forma icosaèdrica de la càpside i la flexibilitat de la cua, així com l'absència d'estructures terminals.

Resultats: caracterització dels bacteriòfags



(b)

Les fotografies obtingudes del fag Φ D7.1 van ser comparades amb les dels fags Φ Bo, Φ DV44.2, Φ 8417 (Denevrolles, 1994). La morfologia que es va observar va ser la següent: una càpsida icosaèdrica que conté l'àcid nucleic i que es perfila en la imatge com un hexàgon. La llargada d'aquesta càpsida és d'uns 75 nm. Una cua llarga i relativament flexible, aquesta es presenta com un tub amb estriacions regulars format per un apilament d'anells. La llargada està entre 425 i 475 nm. A la fotografia no podem observar estructures terminals, ni placa basal ni fibres caudals per la fixació.

Com podem veure, les característiques morfològiques d'aquests fags corresponen al grup B de la classificació de Bradley descrita en els Materials i Mètodes.

3.4.6 - Discussió i conclusions

El problema que havíem tingut fins ara per a la diferenciació dels fags, sembla superat amb la utilització de l'anàlisi del perfil de restricció del seu DNA. Això ens permet de caracteritzar els fags molt millor que quan es fa comparant l'espectre d'hoste. No obstant s'ha presentat la dificultat, durant tot el nostre treball, de la poca quantitat de DNA obtingut i que ha fet que aquest mètode de diferenciació no sigui tant rutinari com voldríem. Aquesta ha sigut una de les limitacions en l'estudi i comparació dels DNA fàgics. Un altre problema han estat les dificultats per obtenir una bona digestió del DNA, quan les digestions són parcials no obtenim el perfil de restricció que caracteritza al fag i per tant serà difícil de reconèixer una altra vegada en restriccions posteriors o de comparar-lo amb altres fags. Aquest fet podria ser degut a que el DNA no està ben purificat i que hi queden restes de PEG, utilitzat en gran quantitat per la precipitació dels fags,

La talla d'aquests fags oscil·la entre 66 i 23 kb aproximadament amb algunes variacions perquè en les electroforèsis s'observen digestions parcials en alguna de les bandes.

L'obtenció del DNA fàgic, a part de la seva caracterització, ha estat utilitzat també per a la construcció de sondes que permetin la seva detecció per hibridació entre els seus DNA. Aquestes sondes no han estat utilitzades però per a la detecció directa dels fags, donat que el mètode de comptatge per la doble capa és més senzill sobretot perquè tenim una sonda indicadora molt sensible, les sondes han servit sobre tot per la detecció de profags es a dir, la presència de DNA fàgic en el cromosoma bacterià com veurem més endavant. En aquest cas l'existència de les sondes ha estat molt útil.

Les diferències que existeixen entre els diferents DNA dels fags no afecta en les hibridacions en *dot blot* entre el DNA fàgic, la qual cosa ens ha permès detectar qualsevol fag utilitzant com a sonda el DNA d'altres fags diferents. Aquest fet ha facilitat molt el

desenvolupament d'aquest treball i la seva continuació perquè, com es podrà veure posteriorment, ens hem servit moltes vegades d'aquesta tècnica per a la detecció dels fags.

El DNA dels fags de *L. oenos* no van donar senyal d'hibridació amb el DNA d'un fag induït de *Lactobacillus plantarum*, la qual cosa vol dir que entre espècies, les diferències en el seu DNA són molt més grans.

La caracterització dels fags va acompanyada també dels seus caràcters morfològics observats al microscopi electrònic. En el nostre cas es tracta de fags que pertanyen al grup morfològic B de Bradley. Aquesta morfologia coincideix amb la trobada per Sozzi *et al.* (1975) en alguns dels fags de vins suïssos sense poder especificar de quina espècie venien i per Jarvis (1984) en estreptococs. La morfologia dels fags de *L. oenos* trobada per Arendt (1992) pertany també al grup B de Bradley.

Podem concloure dient que els fags induïts a partir de soques de *L. oenos* no són tots iguals i que la seva diferenciació es fa per l'anàlisi del perfil de restricció del seu DNA i que els podem detectar per tècniques d'hibridació de DNA.

3.5 - IDENTIFICACIÓ DE LES SOQUES LISOGÈNIQUES DE LEUCONOSTOC OENOS PER HIBRIDACIÓ MOLECULAR.

El mètode d'identificació utilitzat fins ara per determinar si una soca conté o no un profag ha estat el tractament amb la MC, basat en la seva capacitat d'inducció la que provoca la lisi de la població bacteriana, visualitzat seguint la Abs₆₀₀ del cultiu. Encara que aquest test no presenta complicació per a la seva utilització al laboratori, presenta alguns inconvenients com és la rapidesa quan es tracta d'identificar un gran nombre de soques, o la seva sensibilitat a la fase de creixement del bacteri, que fa que a vegades obtinguem com a resultat falsos negatius. Aquest test doncs es pot considerar insuficient en alguns casos, i les dificultats que presenta ens ha portat a buscar una altra alternativa en la identificació de soques lisogèniques.

La identificació de la presència del profag en un bacteri per l'anàlisi directa del genoma, ens hauria de permetre una identificació ràpida i segura. Des de no fa gaire temps s'han desenvolupat mètodes d'identificació de microorganismes, basats en la hibridació de sondes específiques amb el DNA cromosòmic, donant molt bons resultats (Kurita *et al.*, 1986; Petrick *et al.*, 1988; Fremaux, 1990). Aquest mateix principi podria ser utilitzat en la detecció de soques lisogèniques, basat en la utilització de sondes obtingudes a partir del DNA del fag i hibridades amb el DNA bacterià. La temptativa de posar-ho en pràctica serà l'objectiu del nostre treball.

La sonda utilitzada ha de ser capaç de detectar el més gran nombre possible de profags, de manera que una única sonda ens serveixi per detectar els percentatges de lisogènia en la flora indígena o de qualsevol soca utilitzada en el laboratori.

La gran homologia entre el DNA dels diferents fags ens permet detectar els profags amb una sola sonda preparada amb el DNA d'un sol fag. Si no fos així el mètode presentaria un gran inconvenient ja que només podríem hibridar amb fags que presentessin

una forta homologia entre ells i això ens impediria una altra vegada l'estudi d'un gran nombre de soques.

3.5.1 - Detecció del DNA fàgic per hibridació molecular amb el DNA bacterià

a) Determinació dels límits de detecció de la sonda

Fins ara les sondes construïdes a partir del DNA fàgic les havíem utilitzat per a la detecció directa del DNA fàgic total purificat. A continuació es va intentar poder utilitzar aquestes sondes per detectar la lisogènia en les soques de *L. oenos*, es a dir detectar la presència d'un profag en el cromosoma bacterià.

El cromosoma de *L. oenos* és gran ($1,6 \cdot 10^6$ pb) comparat amb el DNA fàgic, aquest fa entre 1/25 i 1/50 del cromosoma, segons el fag. Per això, en les hibridacions DNA bacterià / DNA fàgic caldrà tenir en compte la quantitat de DNA bacterià hibridat, de manera que hi hagi sempre una quantitat suficient de DNA del profag per poder ser detectat. Aquesta quantitat mínima detectable va ser determinada en l'experiència següent:

El DNA purificat de 5 soques (LOD004, D7.1, LOD021, DV40.4 i DV35.5) van ser col·locades sobre una membrana de niló en quantitats diferents: 200ng, 150ng, 100ng, 50 ng, 10ng, 1ng. Es va hibridar amb la sonda Φ DV44.4 a una concentració de 8 ng DNA/ml de solució d'hibridació marcada amb la digoxigenina. Les condicions d'hibridació van ser astringents per evitar les associacions inespecífiques i per assegurar que quan es trobe senyal d'hibridació fos perquè el profag hi era present.

A la figura 3.17c veiem que en aquestes condicions la senyal d'hibridació obtinguda és clara quan les quantitats de DNA provades estan entre 200 ng i 50 ng, encara que són molt evidents entre 200 ng i 100 ng. Quan la quantitat de DNA provat disminueix a 10 ng, el resultat varia entre les diferents soques: per la LOD021 i la DV40.4 la senyal d'hibridació és força clara però, per a la resta de soques la senyal és menys evident. Quan la quantitat provada és d'1 ng veiem que el senyal és clara únicament per a les soques LOD021 i DV 40.4 mentre que per a les altres és quasi inexistent.

Veiem doncs que amb 10 ng de DNA bacterià n'hi ha suficient per detectar el profag integrat en el cromosoma. Calculant el nombre de còpies de cromosomes bacterians i per tant d'un fag que hi ha en 10 ng de DNA bacterià, s'obtenen unes $5,7 \cdot 10^6$ còpies i per tant un mateix nombre mínim de bacteris. Aquesta serà la quantitat mínima de DNA bacterià necessària per a poder fer la detecció per hibridació en *dot-blot*.

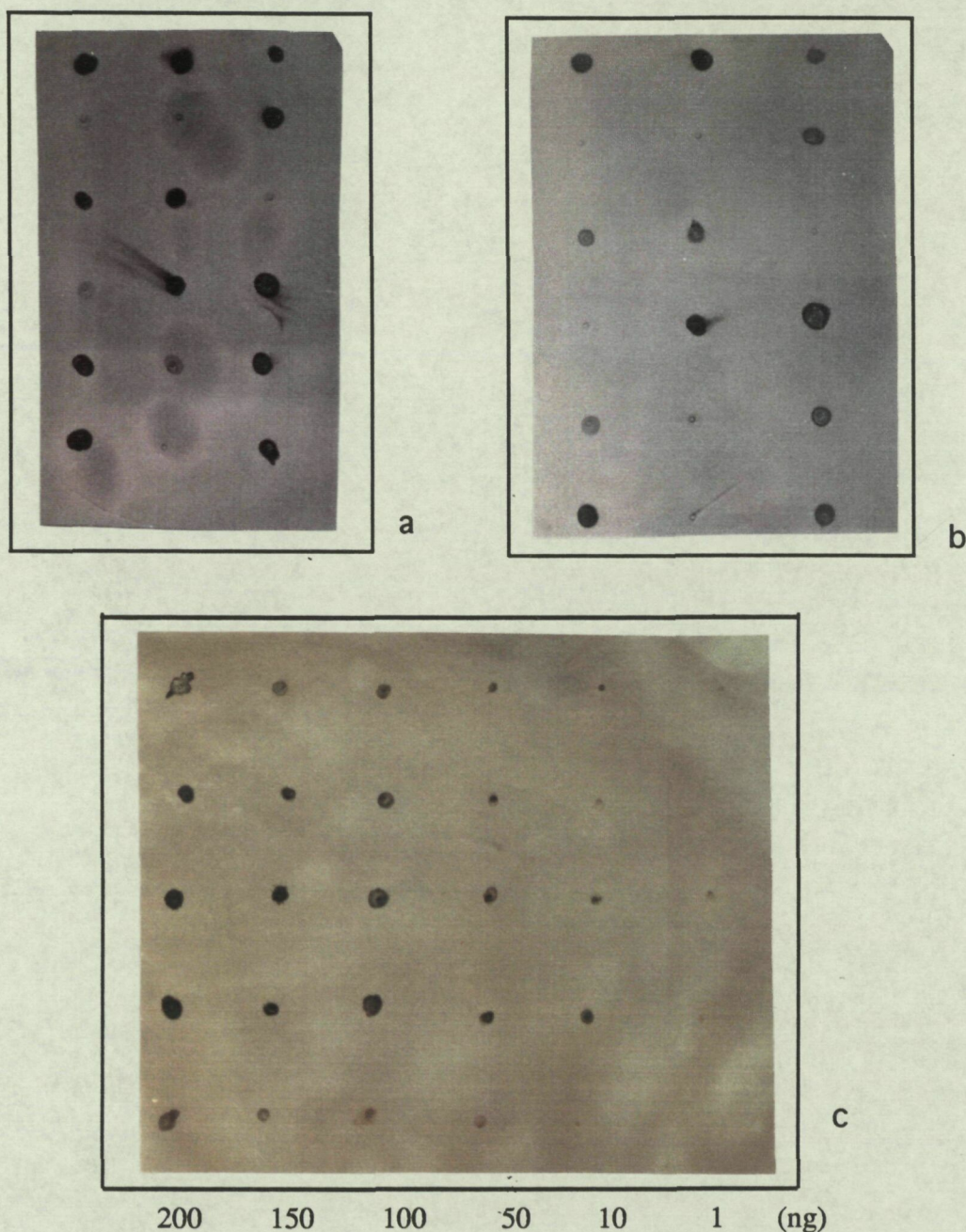


Figura 3.17: a i b resultats de les hibridacions en *dot-blot* entre el DNA de 18 soques de bacteris i la sonda Φ DV44.4 marcada amb la digoxigenina, a: en condicions normals d'hibridació, b: en condicions d'astringència. c: resultats d'hibridació en *dot-blot* entre diferents concentracions de DNA (200ng, 150ng, 100ng, 50ng, 10ng, 1ng) de 5 soques de bacteris amb el DNA del fag Φ DV44.4 marcat amb la digoxigenina.

b) Hibridació del DNA bacterià amb el DNA fàgic

Una vegada coneguts els límits de detecció de la sonda sobre el DNA bacterià total, podem començar a provar les soques de la col·lecció per verificar la seva lisogènia i poder comparar aquests resultats amb els resultats obtinguts amb la mitomicina C. La determinació es va fer per hibridació del DNA bacterià purificat amb una sonda obtinguda a partir Φ DV44.4 marcada amb la digoxigenina.

En un primer assaig es van triar 18 soques (figura 3.17a) de la col·lecció per comprovar la seva condició de lisogèniques. El DNA genòmic d'aquestes 18 soques va ser extret a partir de 100 ml de cultiu en fase exponencial de creixement. La quantitat de DNA així obtingut oscil·lava entre 150-200 ng/ μ l, i van ser resuspesos en 10 μ l d'aigua destilada estèril. La quantificació va ser feta basant-se en la proporcionalitat existent entre la quantitat de DNA i la fluorescència observada sota llum UV en presència de bromur d'etidi; la quantitat de DNA és determinada per comparació amb les quantitats conegudes de les bandes del fag λ digerit per l'endonucleasa *Hind III*.

La fixació sobre membrana es va fer pel mètode de *dot-blot* (fixació del DNA en solució) posat per capil·laritat sobre una membrana de niló prèvia desnaturalització per calentament a 100°C.

Quan hibridem la nostra sonda amb el DNA cromosòmic cal d'estar segurs que no obtindrem hibridacions inespecífiques entre el fag i el bacteri que emmascarin els nostres resultats. Per poder verificar que no existeixen aquests tipus de problemes, la solució seria tenir una soca lisogènica i la mateixa soca a la qual li hauríem eliminat el profag, però això, de moment, no és possible degut a les dificultats per obtenir una soca "curada" del seu profag. Paral·lelament podem fer altres proves que ens donguin també la seguretat que no hi han hibridacions entre el fag i el bacteri.

En primer lloc verificarem si les soques que hem considerat no lisogèniques amb el test de la MC no hibriden amb la nostra sonda, aquesta serà una bona garantia de que el senyal d'hibridació l'obtenim només quan la soca és lisogènica. Es per això que entre les 18 soques n'hem triat 4 de no lisogèniques.

En segon lloc podem utilitzar les condicions d'hibridació que garantitzin una hibridació entre regions realment homòlogues. Les condicions d'hibridació habituals en el nostre treball són d'una astringència considerable, però, per assegurar-nos encara més que la sonda hibrida únicament amb el fag, augmentarem l'astringència de la solució d'hibridació i de les solucions de rentat de la membrana.

Si veiem alguna diferència podem dir que l'astringència en les condicions d'hibridació són primordials per a la detecció del profag.

L'astringència l'augmentem disminuint la concentració de SSC i mantenint la temperatura sempre a 65°C. En la solució d'hibridació (taula 3.8) variem la concentració de sal perquè la temperatura és ja molt astringent. En les solucions de rentat variem la temperatura i la concentració de sal.

Taula 3.8: Condicions d'hibridació utilitzades en la hibridació de les soques de bacteris.

Condicions d'astringència		Condicions habituals	
Solució d'hibridació	3x SSC, 65°C	Solució d'hibridació	5x SSC, 65°C
Solució de rentat	0,1x SSC, 65°C 4 vegades durant 15 minuts	Solucions de rentat	2xSSC 2 vegades 5 minuts a T° ambient 0,1x SSC 2 vegades 5 minuts a 65°C

Després de la hibridació es va observar que les soques que havíem descrit com a no lisogèniques pel test de la MC no hibridaven amb la nostra sonda (figura 3.17b). La resta de soques provades, les quals donaven positiu al test de la MC, donaven també senyal d'hibridació.

La identificació de les soques lisogèniques dóna, fins ara, els mateixos resultats que s'havien obtingut amb el test de la MC. L'únic avantatge que s'obté és que la hibridació ens assegura la presència d'un profag, en canvi quan s'utilitza la MC podem trobar resultats no massa clars que ens obliguin a repetir la experiència i per tant una perdua de temps considerable, tenint en compte el temps de creixement dels bacteris.

El mètode d'hibridació té l'avantatge de ser més ràpid i més segur però té l'inconvenient que s'ha d'extreure i purificar el DNA bacterià. Aquest és un procés relativament llarg, per tant cal trobar una altra manera de detectar el profag.

3.5.2 - Detecció de la lisogènia sobre cèl.lules senceres. Hibridació en *spot* i hibridació sobre colònia

Si podem evitar l'extracció del DNA bacterià per procedir a la hibridació el test és molt més senzill i ens permetrà d'analitzar un gran nombre de soques assegurant un resultat ràpid i segur. Basant-nos en el mètode utilitzat per provar la presència de DNA clonat en bacteris recombinants, es va intentar hibridar la nostra sonda amb el DNA bacterià sobre

una membrana de niló a partir de colònies, tal com s'ha explicat a l'apartat de Materials i Mètodes.

El nombre de cèl.lules de *L. œnos* en una colònia esta als voltants de 10^9 , cosa que vol dir que només que hi hagi una còpia de fag per cèl.lula en tindrem suficient per saber si la colònia està formada per cèl.lules lisogèniques o no, donat que vam veure que el límit de detecció és de $5,7 \cdot 10^6$ còpies. La hibridació sobre colònia la utilitzarem més endavant per a la detecció de soques lisogèniques en una barreja de bacteris desconeguda.

En una placa de Petri es van sembrar 50 soques diferents de la col.lecció IOEB posant sobre el medi sòlid 1µl d'un cultiu de 24 hores de les diferents soques. S'incubarven a 25°C durant 5 dies i després es van transferir les colonies sobre una membrana de niló de la mateixa manera que ho fem per la hibridació sobre colònia. Aquest sistema és pràctic perquè es poden analitzar un gran nombre de soques al mateix temps.

Les senyals d'hibridació a partir de sp^{ot} posat sobre el medi de cultiu són menys netes que quan es fa la transferència sobre membrana a partir d'una sola colònia, el resultat, però, és igualment visible.

De les 50 soques provades, 45 van donar senyal d'hibridació, cosa que representa un percentatge de lisogènia del 90%. Aquest valor és netament més elevat que el percentatge que vam obtenir fent el test de la mitomicina C (45%). Aquesta diferència ve donada segurament pels problemes que presenta la utilització de la MC, com ja hem explicat. La fase de creixement del cultiu és molt important per obtenir un efecte visible. Quan estudiem moltes soques a la vegada, la fase de creixement entre elles pot variar i segurament durant l'anàlisi de les soques en alguns casos vam utilitzar cultius d'una fase de creixement massa avançada, la qual cosa ens va fer obtenir falsos negatius en els resultats. Aquesta es segurament la raó d'aquesta diferència en els percentatges.

Veiem doncs que els percentatges de lisogènia, calculats a partir d'una petita mostra de la població, ens dóna una valor força elevat. No és de extranyar doncs que en el vi es trobin també percentatges elevats de soques lisogèniques.

3.5.3 - Hibridació del DNA d'un fag de *L.œnos* amb el DNA cromosòmic de diferents espècies de bacteris làctics

Per verificar que les sondes utilitzades en el nostre treball són específiques dels fags de *L.œnos* es va fer una hibridació sobre diferents espècies lisogèniques de bacteris làctics que es troben en el vi.

Quan hi ha hibridació entre dues molècules de DNA en condicions d'astringència com les que utilitzem correntment en aquest treball vol dir que es tracta de DNA amb

percentatges d'homologia elevats. Creiem que aquesta homologia no existeix entre fags de diferents espècies, però ho volem verificar.

Les diferents espècies utilitzades en la hibridació pertanyen a la col·lecció IOEB i han estat aïllades de diferents vins:

<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 8607	<i>Lactobacillus plantarum</i> 8512
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 8902	<i>Lactobacillus plantarum</i> 8603
<i>Lactobacillus hilgardii</i> 7701	<i>Lactobacillus plantarum</i> 9113
<i>Lactobacillus hilgardii</i> 8510	<i>Lactobacillus plantarum</i> 8904
<i>Lactobacillus hilgardii</i> 7902	<i>Lactobacillus casei</i> 8606
<i>Lactobacillus hilgardii</i> 9103	<i>Lactobacillus casei</i> 9104
<i>Lactobacillus brevis</i> 8511	
<i>Lactobacillus brevis</i> 8907	

Vam extreure el DNA de les diferents espècies a partir de 10 ml de cultiu. 100 ng de cada DNA va ser col·locat sobre una membrana de niló i hibridat amb dues sondes obtingudes per marcatge fred del DNA dels fags Φ DV44.4 i Φ LOD019. La concentració de la sonda és de 8 ng/ml de solució de hibridació. Les condicions d'hibridació són les descrites en els Materials i Mètodes.

No vam observar senyal d'hibridació en cap dels DNA bacterians. Els fags de *L. oenos* no hibriden amb els profags integrats en el cromosoma bacterià d'altres espècies de bacteris làctics.

Per verificar que es tractava de soques lisogèniques, es va fer el test de la mitomicina C seguint el mateix protocol que es va utilitzar per *L. oenos*. Només vam trobar dues soques que donaven negatiu al test i per tant considerem que no són lisogèniques, aquestes són *Lactobacillus hilgardii* 7902 i *Lactobacillus brevis* 8511, la resta són totes lisogèniques.

Això és important perquè quan detectem un senyal d'hibridació en els nostres treballs podem assegurar que es tracta sempre de fags provinents de *L. oenos* o bé de soques lisogèniques de *L. oenos*.

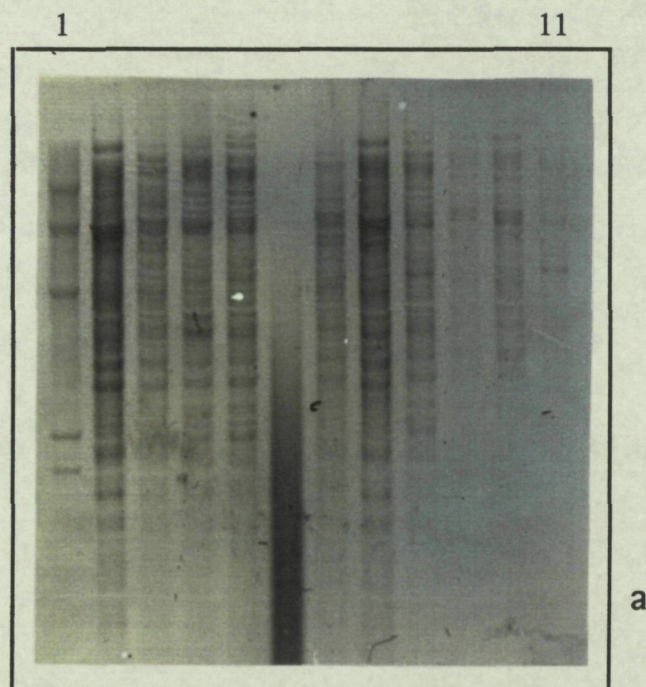
3.5.4 - Tentativa de diferenciació de soques de *L. oenos* per hibridació en Southern del seu DNA amb el DNA fàgic

L'estudi del perfil de restricció del DNA cromosòmic de *L. oenos* permet diferenciar, en alguns casos, les soques entre elles. Aquest mètode, però, és complicat en si mateix pel gran nombre de bandes obtingudes en l'electroforesi del DNA digerit i per la

presència de DNA extracromosòmic específic de cada soca (Fremaux, 1990). Es per això que es continuen buscant altres maneres de poder reconèixer les soques si elles per tal d'identificar aquelles que poden tenir interès.

Les soques que contenen un profag en el cromosoma són, com s'ha vist en els apartats anteriors, fàcilment detectables per hibridació amb una sonda fàgica. Es va pensar que es podria fer una millor explotació dels resultats d'electroforesi utilitzant el mètode de Southern per hibridar després amb el DNA fàgic utilitzat com a sonda.

El DNA genòmic d'11 soques va ser extret segons la tècnica descrita als Materials i Mètodes. Aproximadament 900 µg d'aquest DNA van ser digerits, en presència d'espermidina, la qual afavoreix l'acció de l'enzim de restricció, amb 10 unitats de l'enzim *Eco* RI (figura 3.18 a).

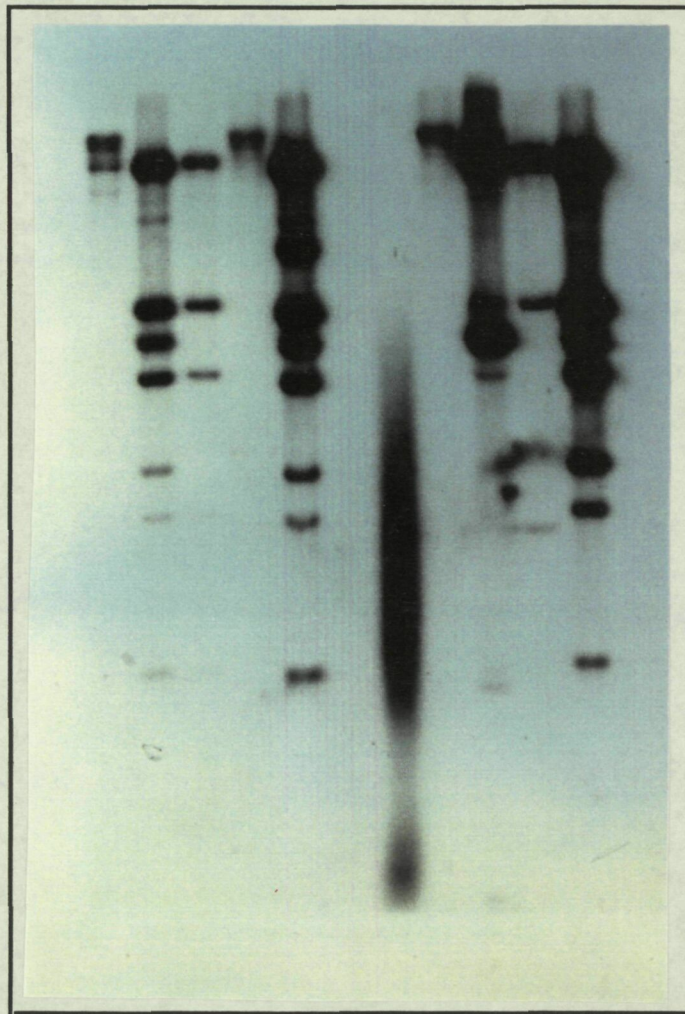


a

Figura 3.18 a: resultats obtinguts a l'electroforesi en gel d'agarosa del DNA cromosòmic d'11 soques, digerit amb l'enzim *Eco* RI. Pista 1: marcador de pes molecular λ *Hind* III, a partir de la pista 2 d'esquerra a dreta les soques són les següents: DV29.2, DV41.1, D7.1, DV42.7, DV13.4, D31.2, DV44.4, DA27.4, DV40.4, DV47.10, DV42.3.

Després de l'electroforesi en gel d'agarosa 0.8%, els fragments van ser transferits sobre membrana de niló i hibridats amb la sonda Φ LOD017 a 65°C durant 12 hores. Els resultats de l'hibridació es mostren a la figura 3.18 b.

Podem observar que els perfils són més senzills; en aquest cas només veiem les bandes que contenen el DNA fàgic.



b

Figura 3.18 b: Resultats de la hibridació en Southern de les 11 soques que es mostren a la figura 3.18 a amb la sonda Φ LOD017 marcada amb ^{32}P . A la pista 6 no es veu senyal d'hibridació perquè es tracta de la soca indicadora no lisogènica. A la pista 1 tampoc hi ha hibridació perquè és el marcador de pes molecular.

Si comparem aquests perfils amb els obtinguts a la restricció d'alguns dels fags provinents d'aquests bacteris, DV41.1, DV13.4 i D7.1 (Figures 3.12 i 3.13) veiem que no coincideixen Això podria venir de les digestions parcials del DNA cromosòmic i fàgic. Aquest és el problema amb el qual ens trobem quan volem diferenciar soques d'aquesta manera i que impedeix utilitzar-lo sistemàticament d'un gran nombre de soques, no obstant, en casos molt concrets es podria utilitzar pel seguiment d'implantació d'una soca en un medi determinat.

3.5.5 - Discussió i conclusions

La utilització de sondes construïdes a partir de DNA fàgic per al reconeixement de soques lisogèniques ha demostrat ser un mètode més ràpid i segur que el test de la mitomicina C. Aquest últim és vàlid quan el nombre de soques és petit i podem determinar bé la fase de creixement dels cultius però, quan treballem amb un nombre elevat de soques, és difícil que totes arribin al mateix temps a la fase de creixement que necessitem. Per altra banda, el seguiment de cada una d'elles per separat complicaria molt el treball. L'avantatge principal de l'utilització de sondes és que el DNA de qualsevol fag hibrida amb el DNA dels altres fags i això ens permet detectar un gran nombre de soques lisogèniques contenint fags diferents. Al mateix temps, els fags de *L. oenos* no hibriden amb els fags d'altres espècies, la qual cosa ens permet saber en tot moment que treballem amb la mateixa espècie.

El límit de detecció de la sonda és elevat i per tant el nombre de bacteris que necessitem per posar-los en evidència és d'un mínim de 10^6 .

La temptativa de diferenciació de soques per hibridació d'una sonda fàgica amb el DNA cromosòmic en Southern, no s'ha mostrat molt eficient, degut a problemes de digestió parcial del DNA cromosòmic. No hem aprofundit gaire en l'utilització d'aquesta tècnica en el nostre treball i per tant no podem assegurar que sigui vàlida per la caracterització de les diferents soques de bacteris i quins resultats podem trobar en el cas de que es canviï de sonda. No obstant, creiem que es podria utilitzar per al seguiment d'una soca ben coneguda de la qual coneixem el seu perfil d'hibridació obtingut a partir de digestions separades amb diferents enzims de restricció, de manera que estigui ben caracteritzat, i en un cas així, aquest perfil el podríem diferenciar d'altres provinents d'una barreja de soques desconegudes.

3.6 - EFECTES DELS BACTERIOFAGS EN ELS CULTIUS DE BACTERIS

3.6.1 - Inducció espontània dels bacteriofags per les soques lisogèniques

L'acció de diferents agents mutàgens sobre un cultiu és la causa d'una sèrie de mutacions sobre els bacteris, que entre altres coses, provoquen la inducció del profag en les soques que són lisogèniques. Aquesta inducció però es pot donar de forma espontània provocant la lisi cel·lular. L'eliminació d'una part de la població degut a aquest fenomen pot tenir importància a nivell industrial, sobre tot si aquesta inducció és elevada.

Aquí es pretèn veure si aquest fenomen és corrent en les soques de *L. oenos* i si afecta o no a una gran part de les cèl·lules d'un cultiu per així poder avaluar la seva importància.

Després d'haver analitzat la nostra col·lecció de soques lisogèniques, s'ha vist compte que en tots els casos hi havia inducció espontània. S'ha intentat quantificar aquesta inducció i comparar entre les diferents soques. També s'ha comparat la inducció espontània i la inducció amb la MC de les diferents soques.

Per verificar la inducció espontània es van agafar 17 soques lisogèniques de la col·lecció i es va procedir de la següent manera: es va fer créixer un cultiu de 10 ml de MRS a 25°C. Al cap de 24 hores es va agafar una alíquota, es va filtrar i van ser recuperats 0,4 ml per fer el comptatge de fags utilitzant el mètode habitual de la doble capa. El cultiu va ser incubat fins a 48 h i després es va fer un segon comptatge.

Els resultats obtinguts van ser els següents:

Després de 48 h d'incubació es va fer el comptatge de fags lliures en els 17 cultius. El nombre de fags varia entre ells; 5 soques presenten una inducció de 10^5 UFP/ml, 5 soques presenten la inducció es de 10^4 UFP/ml, 6 soques per les quals la inducció és de 10^3 UFP/ml, i finalment 1 soca que presenta 10^2 UFP/ml. El nombre de soques expressat

en percentatge i les seves quantificacions de fags corresponents es relacionen en la taula 3.9.

Per a totes les soques lisogèniques en les que es va determinar l'existència d'inducció es van trobar partícules fàgiques lliures en el medi, cosa que fa pensar que la presència de fags en un medi en el qual creixen bacteris lisogènics es un fenomen corrent. En aquests cultius hi ha sempre una part de la població dins del cultiu que indueix espontàniament el fag.

Aquest fenomen és degut a la inactivació del repressor el qual impedeix el cicle de multiplicació normal del fag. La probabilitat de mutació sobre el gen que codifica pel repressor serà la mateixa que per una altra mutació i serà sempre la mateixa per una soca determinada. Per tant la inducció espontània mesurada en UFP/ml en un cultiu bacterià es quasi be sempre el mateix.

El nombre de fags comptats per inducció espontànea al cap de 48 hores de cultiu pot variar entre les soques, i això pot ser degut, a part del sistema de repressió, a la rapidesa de creixement dels bacteris. Si fem el comptatge abans de 48h d'incubació a 25°C no tots els cultius presenten fags induïts. Contràriament, al cap de 48h, si la soca en cultiu és lisogènica, presenta inducció del profag, per tant hem d'estar en plena fase exponencial.

Taula 3.9: Distribució dels percentatges de soques que presenten diferents quantitats d'inducció espontània.

UFP/ml	Percentatge
10 ⁵	29%
10 ⁴	29%
10 ³	35%
10 ²	6%

Problemes que presenta la inducció espontània

Quan resembrem regularment les soques lisogèniques, veiem que aquest conjunt de bacteriòfags en el medi és present contínuament, però no afecta al creixement bacterià. Els cultius presenten una corba de creixement normal i si no fos pel comptatge específic dels fags, no sabríem que hi són presents. En alguns casos, depenent de la soca, la inducció espontània pot ser massiva i produir-se al mateix temps, donant una desaparició completa

del cultiu. Aquest fenomen s'ha pogut verificar en dues soques de la col·lecció les quals manteníem permanentment en cultiu, LOD021 i LOD013.

La desaparició de la població es produïa al cap de 7 - 9 resebrats, depenent dels casos. Aquestes soques que en principi van ser seleccionades per a la seva explotació industrial per la producció d'estarters, van ser eliminades per la seva facilitat a induir el fag, causant enormes pèrdues degut a la disminució completa de la biomassa.

La inducció espontània en les soques lisogèniques ens impedeix d'utilitzar-les com a soques indicadores, sobretot quan multipliquem el fag per obtenir el seu DNA. La barreja de bacteriòfags podria portar algunes confusions en el perfil de restricció.

3.6.2 - Efecte d'una soca lisogènica sobre una soca sensible al profag

La presència d'una soca lisogènica en un medi podria afectar les proporcions de la població de diferents soques sensibles als fags. La inducció espontània de fags en el medi per part dels bacteris lisogènics podria ser l'origen de la desaparició d'aquestes soques. Cal conèixer si les soques sensibles poden sobreviure o són completament eliminades i si això fa augmentar el nombre de fags en el medi.

Aprofitant el fet que tenim una sonda que híbrida amb les soques lisogèniques i ens permet de diferenciar les colònies per hibridació, ens vam proposar de veure si existeix una veritable competència entre dues soques, deguda a la presència del fag induït per una d'elles.

Dues soques lisogèniques (LOD004 i LOD021) incubades durant 48 hores a 25°C, es van sembrar cada una d'elles amb una soca no lisogènica EFA24, sensible als dos fags d'aquestes soques. La sembra es va fer en 300 ml de MRS suplementats amb 25 mM de CaCl₂. Es va fer un comptatge de l'inocul per saber el nombre de bacteris lisogènics que van ser afegits i un comptatge també del nombre de fags que hi havia en l'inòcul. Aquests provenien de la inducció espontània de la soca.

A la taula 3.10 es mostren els resultats obtinguts. El t=0 es el moment en que s'ha fet la barreja de soques. L'inòcul que s'ha afegit ha estat comptat per saber el nombre de bacteris que afegim de cada soca. El nombre de fags a t=0 representa les partícules fàgiques que s'han afegit amb l'inòcul al medi, provinents de la inducció espontànea.

Per la soca LOD021 no trobem inducció espontània en el moment en què es va fer la barreja, cosa que no vol dir que aquesta soca no indueixi espontaneament el seu profag però el moment de la inducció no és el mateix per les diferents soques. En el cas de la soca LOD004 la inducció espontània es important encara que es troba dins dels límits normals

que trobem en les soques lisogèniques de la nostra col.lecció. Despres de 48 hores fem el comptatge de bacteris i de fags en cada un dels dos flascons.

La diferenciació entre les dues soques es pot fer gracies a que LOD004 es lisogènica i EFA24 no ho és. Amb les plaques on s'ha fet el comptatge de bacteris,s'ha fet una hibridació sobre colònia amb una sonda obtinguda a partir del DNA del fag DV44.4 el qual sabem que hibrida amb els DNA de Φ LOD004 i Φ LOD021.

Taula 3.10: Resultats obtinguts del comptatge dels bacteris i dels fags en l'inocul i en la barreja de soques després de 48 hores.

Temps (hores)	Soques	Bacteris/ml	fags/ml
0	EFA24	$1,3 \cdot 10^7$	
0	LOD004	$3,2 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^4$
0	LOD021	$7,6 \cdot 10^6$	absència
48	Bareja de:		
	EFA24	$6 \cdot 10^6$	
	LOD004	$7,7 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^4$
48	Bareja de:		
	EFA24	absència	
	LOD021	$1,1 \cdot 10^7$	$7,6 \cdot 10^4$

Quan comparem el nombre de colònies que donen senyal d'hibridació i el nombre de colonies obtingudes sobre la placa, veiem que en el cas del flascó on hem barrejat LOD004 i EFA24, obtenim 6 colònies que no donen senyal d'hibridació la qual cosa vol dir que no són lisogèniques i per tant deduïm que es tracta de EFA24. El nombre de fags en aquest flasco ha augmentat de $1,1 \cdot 10^4$ UFP/ml, que poden venir de la inducció espontània però sobretot de la multiplicació que s'ha pogut fer sobre la soca sensible la qual ha reduït la seva població en una quantitat de $7 \cdot 10^6$ bact/ml.

En la placa obtinguda amb el flascó on hem barrejat LOD021 i EFA24, trobem que totes les colònies comptades hibriden amb la sonda obtinguda del DNA fàgic, la qual cosa fa pensar que no queda cap bacteri de la soca EFA24. El nombre de fags en el cultiu ha passat a ser $7,6 \cdot 10^4$, cosa que implica una multiplicació ja que si fos solament per inducció espontània la població de LOD021 hauria disminuït en comptes d'augmentar.

Podem veure doncs que la presència d'una soca lisogènica en un cultiu de soques sensibles pot modificar les proporcions en les poblacions. El mètode d'hibridació sobre

colònia utilitzant les nostres sondes obtingudes a partir del DNA d'un fag, ens permet de verificar i quantificar aquestes variacions encara que estem limitats sempre a determinar la competència només entre soques lisogèniques i no lisogèniques. Aquesta competència ha estat determinada solament en medi de cultiu MRS i no en el vi. Depenent del medi en el qual es troben els bacteris aquesta competència pot variar.

3.6.3 - Discussió i conclusions

La inducció d'un profag semblava, en un principi, lligat a la presència d'algun agent mutagen en el medi, o si més no, a la presència de compostos que podrien provocar aquesta inducció. No obstant, es va poder verificar que en condicions normals de creixement, en medi de cultiu no addicionat per cap agent extern, es podien posar en evidència partícules fàgiques infectives, les quals provenien de la inducció espontània dels profags integrats en el cromosoma dels bacteris lisogènics que estaven en cultiu. Aquesta inducció es constant i es manté al llarg del creixement de la població bacteriana. El represor codificat pel DNA del profag li permet de mantenir-se dins el bacteri sense expressar-se. A cada generació, aquest represor que assegura el manteniment del profag en estat latent es desnaturalitza en una petita part de la població bacteriana on el fag segueix un cicle de multiplicació virulent. Es doncs explicable que es trobin sempre fags lliures en un cultiu de cèl.lules lisogèniques. Es aquesta inducció espontània, la que dóna lloc als problemes en la utilització de soques lisogèniques en els processos de fermentació industrials i en el cultiu de bacteris per a la obtenció d'estàrters.

L'inconvenient d'aquesta inducció es dóna a dos nivells. D'un costat en el cas de cultius industrials en què es produeix una sola soca, la inducció espontània pot ser massiva en un moment donat i fer desaparèixer tota la població bacteriana. Per altra banda, quan ens trobem amb cultius mixtes de diferents soques i entre elles n'hi ha de lisogèniques que indueixen el seu profag, podem eliminar les altres soques, en el cas que aquestes siguin sensibles al fag, la qual cosa faria disminuir el nombre de bacteris i per tant la producció tant de biomassa, en el cas de la producció d'estàrters, com en la pèrdua de producte final de fermentació.

L'efecte que poden tenir les soques lisogèniques sobre les soques no lisogèniques sensibles al seu profag, era fins ara difícil d'observar degut a la dificultat de diferenciar les soques entre elles. La possibilitat d'utilitzar una sonda de DNA fàgic que ens pugui posar en evidència les soques que contenen un profag, ens permet fer una primera diferenciació

entre elles. Aquestes sondes ens permeten també valorar les variacions en la població de las diferents soques.

La utilització d'aquest mètode no deixa de ser però molt limitat degut a que només podem diferenciar dues soques una de les quals ha de ser lisogènica. Si és aquest el cas, podem seguir el procés d'implantació de les soques en un medi determinat o bé detectar la seva pèrdua.

En aquest treball s'ha intentat veure si el fag induït espontàniament per una soca lisogènica podia afectar a la supervivència d'una altra soca sensible a aquest fag. Els resultats que hem pogut observar són que el fag afecta a la soca sensible. En el cas de la barreja de la soca EFA24 i LOD004, el nombre de fags al cap de 48 hores augmenta, en part per la inducció espontània i en part també per la seva multiplicació sobre la soca EFA24. Si s'haguessin fet els comptatges de fags durant més temps (3-4 dies) segurament el nombre de fags seria més elevat que al cap de 48 h degut a que la soca lisogènica hauria tingut més temps per induir els fags. Això ens hauria permès comprovar si la soca sensible era completament eliminada del cultiu o bé si la quantitat de fags induïts no seria mai suficient per contrarestar el creixement bacterià i la lisi seria només d'una part de la població. Aquests dos punts s'haurien de verificar.

En el cas de la barreja de les soques EFA24 i LOD021 al cap de 48 hores no queda cap bacteri no lisogènic. Aquests han desaparegut sens dubte degut a la infecció pels fags induïts de la soca lisogènica. En aquest cas la influència d'una soca sobre l'altra ha estat molt dràstica provocant la seva eliminació però no podem assegurar que sigui en tots els casos igual i que algunes soques poguessin conviure amb fags que poden lisar-les.

3.7 - MODIFICACIONS DE L'ESTAT DE LISOGÈNIA EN LES SOQUES DE *LEUCONOSTOC OENOS*.

3.7.1 - Temptativa de lisogenització d'una soca no lisogènica

Fins ara, les soques lisogèniques amb les quals s'ha treballat, contenen el profag integrat en el cromosoma bacterià des del moment del seu aïllament del vi. L'estat de lisogènia es troba molt sovint a la natura. Els percentatges de lisogènia descrits a la bibliografia són sovint elevats, com s'ha vist també en el nostre treball .

La forma en què un bacteri esdevé lisogènic no està encara massa clar ja que quan el fag infecta el bacteri té dues possibilitats: seguir el cicle lític o bé el cicle lisogènic. La continuació de la seva multiplicació o la seva integració depèn de diferents factors de regulació provinents del bacteri, del fag i de les condicions de cultiu. En el fag λ la freqüència del fenomen de lisogènia depèn de la quantitat de repressor produït en el moment de la infecció. A la bibliografia sembla bastant extesa la idea de què barrejant un fag atemperat amb un bacteri no lisogènic i susceptible de ser infectat pel fag, aquest incorpora el DNA del fag al seu cromosoma, passant a un estat de lisogènia. Quan això s'ha intentat fer al laboratori s'ha vist que el procés de lisogeneització és difícil d'aconseguir, perquè no tots els fags atemperats són capaços d'integrar-se en el genoma bacterià (Barksdal i Arden, 1974). En els bacteris làctics no s'ha trobat cap treball en aquest sentit.

L'interès de la lisogenització d'una soca no és altra que la de trobar un vector que faci possible la integració d'un material genètic extern a la cel.lula en el cromosoma bacterià. En aquest sentit, s'han fet alguns intents utilitzant un fag aïllat directament del vi sobre una soca de *L. oenos* sensible al fag (Denayrolles M., 1994), que no van donar bons resultats. En realitat no es coneixia si el fag utilitzat podia seguir el cicle lisogènic ni si el bacteri era susceptible de ser lisogenitzat. Per això creiem que és important conèixer la capacitat i el percentatge de lisogenització entre un bacteri i el fag, la qual cosa ens donarà

una idea de si és possible o no la integració. No obstant això no ens assegura que sigui possible.

Aquí s'ha intentat integrar el DNA d'un fag aïllat directament del vi a un bacteri no lisogènic i sensible a aquest fag. El mètode utilitzat reproduceix les condicions naturals en les que es podria donar la lisogenització, és a dir, posar en contacte el fag i al bacteri.

L'elecció del fag i del bacteri s'ha fet seguint el criteri que només es poden lisogenitzar les soques de bacteris que són capaços de ser infectades pel fag i que aquest ha de ser lisogènic, és a dir, que ha de tenir els mecanismes necessaris per integrar-se en el cromosoma bacterià.

El fag triat en el nostre experiment ha estat aïllat del vi. Fins ara, a la bibliografia, tots els fags aïllats del vi s'han considerat com a fags virulents, es a dir, que han perdut la capacitat d'integrar-se al cromosoma bacterià. El fet que aquests fags es multipliquen més ràpidament que els fags de col·lecció i amb una eficiència més elevada, va fer pensar també que es tractava de fags virulents, però no obstant ho vam verificar intentant la seva lisogenització en la soca D31.2.

a) Descripció del mètode utilitzat

Un cultiu de 24 hores de la soca D31.2, utilitzada com a soca indicadora en el nostre treball, s'ha posat en contacte amb el fag Φ T92.2, aïllat directament del vi, en una concentració final de $1 \cdot 10^7$ UFP/ml en 10 ml de MRS. El medi de cultiu és suplementat amb 25 mM de CaCl_2 . S'incuba durant 48 hores a 25°C, fins a l'obtenció d'un lisat que podem observar directament per comparació amb un cultiu control al qual no se li ha afegit el fag.

Recuperem els bacteris que han sobreviscut a la infecció perquè normalment són les cèl·lules que han integrat el fag al seu cromosoma, centrifugant el lisat durant 10 minuts a 12000 xg El sediment es resuspèn en 1 ml de MRS i es sembra sobre MRS sòlid després d'haver fet les dilucions convenients, a fi d'obtenir diferents clons i analitzar la seva possible lisogènia.

b) Detecció dels clons lisogenitzats

Per detectar els clons que han incorporat el bacteriòfag es fa una hibridació sobre colònia, la qual ens permet de discernir ràpidament, sense necessitat de tractar els clons un per un, reconèixer els que han incorporat el bacteriòfag. Les colònies són transferides

sobre membrana de niló i hibridades amb la sonda obtinguda a partir del DNA de Φ LOD019. El DNA d'aquest fag hibrida amb el DNA del fag T92.2 i es per això que el podem utilitzar com a sonda per la hibridació.

La sonda s'obté pel marcatge de 10 ng del DNA total del bacteriòfag. El mètode utilitzat es el marcatge fred amb la digoxigenina. Després de desnaturalitzar la sonda a 100°C durant 10 minuts s'hibrida amb el DNA bacterià fixat sobre la membrana.

Les plaques de Petri utilitzades per transferir sobre membrana es tornen a posar a 25°C durant 5 dies per fer créixer novament les colònies i així poder ser recuperades més tard. Les colònies que hibriden són localitzades sobre les plaques per comparació amb la membrana i recuperades per posar-les en cultiu dins 1 ml de MRS que serà incubat a 25°C durant 48 hores.

Dues plaques han estat transferides sobre membrana contenint cada una d'elles 46 i 52 colònies. La senyal d'hibridació és detectada en tres colònies de cada una de les plaques. Les 6 colònies són recuperades, a més d'una colònia que no hibrida, la qual ens servirà de control.

Els clons han estat numerats d'1 a 8. El clon n. 8 correspon a la colònia que no dona senyal d'hibridació, els set clons restans s'han numerat d'1 a 7 i coresponen a les colònies que donaven una forta senyal d'hibridació.

El percentatge de soques lisogènitzades que es troben en aquest experiment es de 6,5-9,6%. Aquest percentatge però serà verificat per altres tècniques per a la seva confirmació.

La freqüència de lisogeneització s'ha provat una segona vegada utilitzant el mateix mètode. Després de la hibridació de les colònies amb la mateixa sonda que en el cas anterior trobem que el percentatge d'hibridació és del 7% del total de colònies obtingudes, valor que no s'allunya massa del trobat la primera vegada.

c) Inducció del profag

Una primera verificació de la integració del DNA fàgic dins el cromosoma bacterià és la seva inducció amb mitomicina C. Cada un dels set clons es van posar en cultiu en dos tubs de 10 ml de MRS. A un dels tubs se li afegeix la mitomicina C en una quantitat final d'1 µg/ml. Després de 48 hores d'incubació s'observa a simple vista l'existència del lisat.

Per als clons n. 1, 2, 4, 5, 6, 7 podem veure, a simple vista, una lisi quasi completa del cultiu per comparació amb el cultiu control; per al clon n. 8 la MC no afecta el seu creixement donat que no és lisogènic. Per al clon 3 no hi ha senyal de lisi després de la inducció amb la MC.

Per posar en evidència l'existència de partícules fàgiques induïdes després del tractament amb la MC, es va fer un test en gota sobre la soca indicadora D31.2 dels vuit clons. Els tubs contenint la MC van ser centrifugats i el sobrenadant recuperat per ser provat per la presència de bacteriòfags.

Els resultats obtinguts després de 48 hores d'incubació van ser els següents: per als clons n^o3 i 8 no s'observava cap zona de lisi sobre el tapís bacterià; contràriament, per a la resta de clons la zona de lisi era evident la qual cosa ens confirmava la presència de partícules víriques infectives després de la inducció amb MC.

3.7.2 - Discussió i conclusions

Els resultats obtinguts mostren que Φ T92.2 ha lisogenitzat una part dels bacteris en un percentatge entre el 6,5 i el 9,6%. La primera cosa que podem dir és que es tracta d'un fag atemperat que pot tenir un cicle biològic lític o bé lisogènic. Sent així, és d'esperar que s'integri en alguns bacteris. Aquest fet ha quedat demostrat quan s'ha obtingut senyal d'hibridació utilitzant la sonda fàgica sobre el cultiu bacterià.

Aquests resultats són interessants si pensem que aquest fag podria ser utilitzat en la transformació de *L. oenos*. El problema està en que aquest material genètic incorporat al cromosoma bacterià no és sempre estable i es pot perdre. En els nostres resultats veiem que després de 4 resembrats dels clons lisogenitzats el test de la MC donava negatiu, és a dir, que els bacteris no eren lisogènics. Els treballs sobre aquest punt s'haurien de continuar per tal de trobar una soca capaç de ser lisogenitzada.

Una altra conclusió important és que es poden trobar fags atemperats en el vi i que no han de ser sempre fags que segueixin un cicle lític. Poden venir, com ja hem vist en el punt anterior, de la inducció espontània dels bacteris, sens tractar-se necessàriament de fags virulents.

3.8 - RECERCA DE BACTERIÒFAGS EN EL VI DURANT LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA

La presència de partícules fàgiques durant la fermentació malolàctica en els vins de Bordeus no s'havia posat encara en evidència fins aquest moment. Fins ara, els bacteriòfags utilitzats en el nostre treball habien estat induïts a partir de bacteris lisogènics aïllats del vi, amb la MC. La possibilitat que els bacteriòfags siguin la causa de algunes parades en la FML no havia estat reconeguda fins ara, atribuint-se sempre a altres factors que afecten la flora làctica com la temperatura, pH o SO₂. Les poques referències que es troben en la literatura en aquest sentit havien estat donades per Sozzi *et al.* (1976) quan va observar per microscòpia electrònica la presència de fags en vins amb problemes de fermentació malolàctica, Nel *et al.* (1976) i Davis *et al.* (1985) van poder posar-los en evidència utilitzant una soca sensible (D 31.2) i observant les plaques de lisi que produïen.

El que no està encara ben clar es si aquesta presència de bacteriòfags en el vi està sempre relacionada amb dificultats en la fermentació malolàctica o bé es tracta d'un fenomen corrent el qual no implica l'existència de problemes per al desenvolupament de la fermentació.

La presència de bacteriòfags podria indicar un mal desenvolupament de la fermentació per dues raons diferents: o bé per una inducció massiva dels profags en les soques lisogèniques, la qual cosa provocaria la lisi d'una gran part de la població bacteriana i la conseqüent parada de la fermentació o bé per una inducció moderada de profags per part de les soques lisogèniques i una posterior infecció de les soques sensibles a aquests fags presents en la flora indígena.

Per tal de poder aclarir aquest problema es va buscar la presència de bacteriòfags en vins que tenien dificultats en la fermentació malolàctica i en d'altres en que aquesta es feia normalment. La presa de mostres es va fer durant les vinificacions de 1992 en el període de la FML. Una vegada aclarit el problema es va voler veure si l'aparició dels fags coincidia

amb el desenvolupament massiu de les bacteris làctiques després de la fermentació alcohòlica i més precisament si coincidía amb la presència de *L. œnos* en el vi.

Per això l'any següent, quan la presència de fags ja estava verificada en els vins, es va fer un seguiment desde el most fins al final de la fermentació malolàctica. Durant les vinificacions de 1993 es van agafar mostres de diferents vins de la regió bordelesa per tal de determinar la presència de fags, el seu origen, el moment de la seva aparició i la seva relació amb problemes en la fermentació malolàctica.

3.8.1 -Recerca de bacteriòfags en el vi durant la fermentació malolàctica

Durant les vinificacions de 1992 es va buscar, per primera vegada en vins de Bordeus, la presència de fags. Les mostres es van agafar de vins en que la FML estava a punt de acabar-se i per tant amb una població de bacteris làctics important.

Els fags es van posar en evidència mitjançant l'observació de la formació de plaques de lisi sobre un cultiu de la nostra soca indicadora, D 31.2. En alguns casos es va provar també sobre la soca EFA 24.

a) Descripció de l'experiència

Les mostres es van prendre de quatre cubes diferents, dues del *Château H* i dues cubes del *Château L*, on la FML estava a punt de finalitzar, el seu seguiment es va fer mesurant la desaparició de l'acid màlic per anàlisi enzimàtica. La FML no es va presentar amb retard ni es van observar cap tipus de problemes per al seu començament, de manera que a finals del mes d'octubre ja estava acabada en les quatre cubes.

Cubes 1 i 2 : apertanyen al *Château H* (denominació d'origen Pessac-Leognan, Bordeus)

Cubes 3 i 4 : apertanyen al *Château L* (denominació d'origen Medoc, Bordeus)

De cada una de les cubes s'ha prè una sola mostra la qual ens ha permès veure la presència de fags en un moment determinat. No obstant, el fet de no fer un seguiment durant el temps que dura la FML no ens permet de saber el que passa ni abans ni després pel que fa a l'aparició o desaparició dels bacteriòfags.

Les mostres de vi es van tractar de la següent manera: els comptatges de fags es van fer pel mètode de la doble capa un dia després d'haver pres les mostres, i aquestes es van guardar a 19°C durant tota la nit sense ser filtrades ni dilució posterior.

En el moment de fer el comptatge el vi va ser centrifugat durant 15 minuts a 12000 xg i filtrat a través d'una membrana de 0,45 µm per tal d'eliminar la flora indígena. El volum de vi utilitzat pel comptatge és de 0,4 ml de mostra filtrada.

De la mateixa mostra de vi es va fer el comptatge de bacteris. La mostra de vi va ser diluïda i sembrada sobre MRS sòlid complementat amb 0,05 mg/ml de pimaricina per impedir el creixement dels llevats.

Després de fer els diferents comptatges de fags i bacteris i de quantificar l'àcid màlic del vi, es van obtenir els resultats descrits en la taula 3.11.

En cada un dels *Château* la FML s'ha fet sense cap tipus de problema, no hi ha hagut dificultats per al seu inici ni durant la fermentació. Els bacteris són presents en totes les cubes, el nombre existent al final de la FML indica que aquesta s'ha pogut fer sense cap problema. La quantitat d'àcid màlic és molt petita indicant que la fermentació està acabada.

Pel que fa als bacteriòfags els resultats són diferents en els dos *Châteaux*. Mentre que en un (H) no trobem presència de fags, contràriament en el *Château* L es troba un nombre de l'ordre de 4-5 10³ UFP/ml, similar en les dues cubes tot confirmant la presència de fags en el vi.

Taula 3.11: Resultats obtinguts del comptatge de bacteris i fags i de la quantificació d'àcid màlic en les quatre cubes testades provinents de dos *Châteaux* diferents al final de la FML.

	cuba 1	cuba 2	cuba 3	cuba 4
UFC/ml	2,6 10 ⁷	3,8.10 ⁷	4,2.10 ⁶	9,3.10 ⁶
acid màlic (g/l)	0,15	0,11	0,21	0,19
UFP/ml	0	0	3,9.10 ³	5.10 ³

El nombre de fags comptats no és molt elevat en comparació al nombre de bacteris. Per poder donar una explicació caldria saber d'on venen aquests fags presents en el vi, si el

seu origen són els bacteris o es troben ja en el vi molt abans, suposició no gaire lògica si pensem que es tracta de fags de *L. oenos* i no d'una altra espècie.

Per verificar que efectivament els fags provenien de les soques lisogènics de *L. oenos* es va determinar el percentatge de lisogènia en els bacteris aïllats del vi al mateix moment que els fags. La detecció es va fer per hibridació sobre colònia en les condicions utilitzades correntment en el nostre treball. La sonda es va obtenir per marcatge fred del DNA de Φ DV44.4.

Comparant el nombre de colònies obtingudes per placa amb el nombre de colònies que hibriden amb la sonda, podem saber el percentatge de lisogènia. En el cas del *Château L* vam trobar un 81% de soques lisogèniques. Aquesta quantitat és força elevada i s'aproxima al percentatge que havíem trobat fent el test amb les soques de la col·lecció. Aquest valor elevat ens explicaria l'origen dels fags en el vi; la inducció espontània d'una part de la població lisogènica seria la causa de la presència de les partícules fàgiques.

Si suposem que les partícules fàgiques que hem trobat provenen dels bacteris lisogènics l'absència relativa de fags podria ser explicada per el baix nombre o a l'absència de bacteris lisogènics, tenint en compte que no tota la població de bacteris conté un profag en el su genoma. La proporció de lisogènia en la flora indígena pot ser variable i quan és molt petita la inducció dels fags també ho serà. El percentatge de lisogènia en el vi provinent del *Château H* va ser igualment determinat pel mètode d'hibridació sobre colònia. En aquest cas observem que el nombre de colònies que hibriden comparat al de colònies crescudes sobre la placa és molt petit, donant un percentatge de lisogènia del 24%. Aquesta seria la raó per la qual no detectem fags en el vi. Una altra causa podria ser també que els fags no poden lisar la soca indicatriu. En realitat no ho podem saber però el baix percentatge de lisogènia explicaria els resultats obtinguts. En la figura 3.19 es mostren les hibridacions sobre colònia obtingudes a partir dels bacteris del vi.

La presència de fags, en el nostre cas, no està relacionada amb dificultats perquè es produeixi la FML tenint en compte els resultats obtinguts. Podem veure que la degradació de l'àcid màlic s'ha fet sense cap problema i en un marge de temps semblant en els dos *Château*, la qual cosa fa pensar que l'existència de fags en el vi no ha condicionat la FML ni ha provocat una disminució de la població de bacteris làctics en relació al nombre que trobem en les dues primeres cubes.

Les raons per les quals no podem posar en evidència els fags en el primer cas poden ser diverses:

- perquè en realitat no hi han fags en el vi.
- perquè la soca indicadora que utilitzem no és sensible als fags existents.
- perquè el nombre de fags és molt petit i el mètode no és capaç de detectar-los.



(a)



(b)

Figura 3.19 : Membranes de niló mostren les senyals d'hibridació sobre colònia obtingudes amb la sonda Φ DV 44.4 sobre bacteris aïllats del vi. (a) Resultats obtinguts amb les colònies provinents del *château* L. (b) Resultats obtinguts amb les colònies provinents del *château* H.

b) Caracterització dels fags aïllats

Al cap de 48 hores d'incubació de les plaques per al comptatge de fags es va observar la presència de plaques de lisi sobre el cultiu bacterià.

El mida d'aquestes clapes de lisi era variable. La barreja de tamany en el diàmetre es podia observar en les clapes provinents de les dues cubes. Els diàmetres es trobaven entre 0,5 i 2 mm. Entre les clapes de diàmetre més gran (1,5-2 mm) es podien diferenciar les que presentaven un aspecte tèrbol de les que eren completament clares respecte del tapís bacterià. Aquestes diferències de morfologia fan pensar que no es tracti sempre del mateix fag.

Per poder estudiar els fags aïllats i ser comparats amb els fags induïts a partir de les soques lisogèniques, es van recuperar 14 plaques de lisi. Aquestes es van utilitzar per multiplicar els fags a fi d'obtenir-ne quantitats més importants. Les condicions de multiplicació van ser les mateixes que havíem utilitzat fins ara per els fags induïts. La placa de lisi va ser inoculada a 10 ml d'un cultiu de la soca D31.2 incubada durant 24 hores a 25°C i amb 25 mM de CaCl₂.

Després de 24 hores d'incubació ja es pot apreciar el lisat si es compara amb un tub control sense fags. La lisi cel·lular és evident a simple vista, ja que la terbolesa del medi de cultiu és inexistent, la qual cosa ens indica que la capacitat d'infecció es molt elevada. Aquesta rapidesa d'infecció contrasta amb el temps necessari per multiplicar els fags induïts, pels quals es necessari al menys 48 hores per veure el lisat a simple vista.

De les 14 plaques recuperades s'en van aconseguir multiplicar 10, i les altres quatre no van donar un lisat sobre la soca indicatriu. És possible que les plaques que no han donat un lisat a simple vista s'hagin multiplicat igualment però de manera menys eficaç. Aquests fags que no es multipliquen bé els hem abandonat perquè és molt difícil de treballar-hi, per la qual cosa hem decidit de conservar solament els que són capaços de multiplicar-se fàcilment.

Els lisats obtinguts després del cicle de multiplicacions es van provar per determinar l'espectre d'hoste dels diferents clons sobre una sèrie de soques de la col·lecció (Taula 3.12). Podem diferenciar dos tipus de plaques de lisi, les que són completament clares i les que anomenem tèrboles, és a dir que presenten un gran nombre de colònies molt petites ocupant l'espai de la placa de lisi encara que el nombre no és suficientment gran per confondre la placa de lisi amb el creixement bacterià. D'entre totes les soques analitzades només la LOD013 presenta resistència a alguns dels fags, per a la resta de soques trobem que són sensibles a tots els clons.

Taula 3.12: Espectre d'hostes corresponent als fags aïllats en el vi sobre diferents soques de la col·lecció.

Fags	Soques de bacteris						
	LOD013*	LOD004*	LOD017	LOD019	LOD021*	LOD 023	D31.2
Φ1T1	C	C	C	C	T	C	C
Φ1T2	-	C	C	C	T	-	C
Φ1T3	-	C	C	C	C	C	C
Φ1T4	-	C	C	C	C	C	C
Φ1T5	-	C	T	C	C	C	C
Φ1T6	C	T	C	C	C	C	C
Φ1T9	-	C	C	C	C	C	C
Φ1T10	C	C	C	C	C	C	C
Φ2T4	-	T	C	C	C	C	C
Φ2T10	-	T	C	C	C	T	C

C: plaques clares T: plaques tèrboles

-: absència de placa de lisi

*: soques lisogèniques

Donat que l'espectre d'hostes dels diferents clons no ens aporta massa informació per a la diferenciació dels fags, es va decidir d'utilitzar tècniques de biologia molecular per aquest propòsit.

c) Caracterització dels fags pel seu DNA

Després de la multiplicació dels diferents clons en 100 ml de cultiu bacterià es va procedir a l'extracció del DNA fàgic per fer el seu perfil de restricció. Per això és important que el DNA estigui el menys degradat possible. La quantificació sobre gel de agarosa donava una quantitat de DNA entre 150 i 200 ng a partir de 100 ml de lisat. Aquestes quantitats són insuficients si volem fer diverses digestions. Es van digerir 800 ng d'aquest DNA amb 10 unitats d'enzim de restricció *Eco* RI durant 8 hores, després es va analitzar sobre gel d'agarosa al 0.8%.

Els perfils de restricció dels diferents clons obtinguts són a la Figura 3.20. Es poden observar un nombre considerable de bandes, però es poden diferenciar bé entre elles. La mida d'aquestes bandes es troba entre 9,5 kb i 0,5 kb i les intensitats són diferents. Les bandes de DNA més intenses corresponen a la superposició de fragments de la mateixa mida.

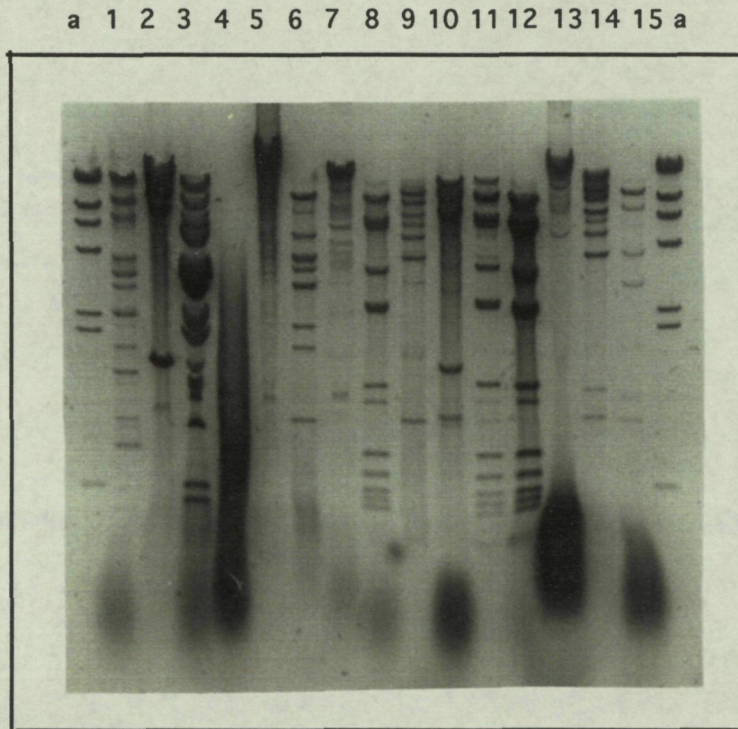


Figura 3.20 : Perfils de restricció obtinguts per la digestió amb *Eco* RI dels fags aïllats en el *château* L. A partir d'aquestes digestions es va calcular la talla d'alguns d'ells.
a: marcador del pes molecular: λ *Hind* III.

Els perfils obtinguts demostren una diferència entre alguns d'ells. Φ 1T1, Φ 1T6 i Φ 1T9 són molt semblants, i en realitat es podria dir que són idèntics encara que es poden veure algunes bandes diferents. Això es degut segurament a una digestió parcial del DNA. El fag Φ 1T6 presenta una banda de aproximadament 15 kb la qual no està ben digerida i hauria d'haver donant lloc a fragments més petits.

Per verificar-ho necessitaríem digerir el DNA per altres enzims de restricció comparant així si els resultats coincideixen, però tenim la dificultat d'obtenir grans quantitats de DNA fàgic. Per als altres clons digerits, no podem dir gran cosa, són diferents entre ells però tant en Φ 1T4 i Φ 2T4 hi han digestions parcials que emmascaren el perfil.

d) Determinació de la talla dels diferents fags

A la Figura 3.20 es poden observar els diferents perfils de restricció, i a partir d'aquesta fotografia s'han calculat la mida dels diferents fags (Taula 2.13).

Taula 3.13: Pes molecular d'alguns dels fags aïllats del vi calculats a partir del perfil de restricció que es mostra a la figura 3.20.

Nº de pista	talla (kb)
1	59,44
6	40,30
8	26,57
9	40,98
14	43,95
15	24,10

En les pistes 1, 2, 3, 4, 6, 11, 12 es pot observar que el DNA està degradat o mal digerit i per tant no es poden diferenciar bé les bandes. Pel que fa a la mida veiem que es troben entre els mateixos límits que els nostres fags de col.lecció. Les diferències entre ells no són molt grans.

La mida calculada només és una estimació ja que és difícil de mesurar les distàncies de bandes molt pròximes les quals, a vegades, es veuen sobreposades.

3.8.2 - Recerca de bacteriòfags en vins en curs de fermentació malolàctica

La recerca de bacteriòfags fins ara s'ha fet en un nombre reduït de vins. Durant les vinificacions de 1993 es van buscar vins de diferents regions de França, en tots els casos vins negres, durant la fermentació malolàctica. En alguns casos es va poder obtenir el vi abans de la FML i durant la fermentació.

Es va fer un comptatge de fags (mètode de la doble capa) per veure si les quantitats diferien molt entre elles (taula 3.14). Els vins dels diferents orígens s'anomenen per un número d'ordre sense citar la propietat de la qual provenen.

Taula 3.14: Comptatges de fags fets en alguns vins francesos de diferents orígens abans i durant la FML durant les vinificacions de 1993.

Propietat	UFP/ml abans la FML	UFP/ml durant la FML	origen
1	nd	2,4 10 ²	Bordeus
2	nd	2 10 ²	“
3	nd	1,9 10 ²	“
4	absència	2,6 10 ²	“
5	nd	4,1 10 ²	“
6	absència	230	“
7	absència	3,6 10 ²	Beaujolais
8	nd	560	Cotes du Rhône
9	nd	absència	Sud-est França
10	nd	absència	“
11	nd	absència	“
12	nd	absència	“

nd: valor no determinat

En els vins n° 9, 10, 11, 12 no vam poder determinar la presència de plaques de lisi. El comptatge de fags es va fer pel mètode habitual sobre la soca indicadora D31.2.

El fet de no trobar plaques de lisi no ens assegura que no hi hagin fags dins el vi, l'únic que ens indica és que no podem detectar-los, possiblement perquè la nostra soca indicadora no és suficientment sensible.

Per verificar que realment no hi han fags en aquests vins es va fer una altra prova, fent una hibridació sobre colònia a partir dels bacteris presents en el vi durant la FML i una sonda obtinguda a partir del DNA fàgic, i d'aquesta manera vam posar en evidència les soques lisogènics de *L. œnos*. Si no hi han soques lisogènics podem pensar que és normal de no trobar fags ja que aquests provenen de la inducció bacteriana. Contràriament, si hi ha

hibridació, vol dir que existeixen soques lisogènics i per tant s'haurien de trobar partícules fàgiques en el vi.

Per als vins n. 9 i 10 no es va poder observar senyal d'hibridació sobre les colònies aïllades. Aquest resultat ens indica que no existeixen soques lisogènics la qual cosa és inesperada donats els percentatges de lisogènia que havíem obtingut, encara que no impossible. Podria ser que la nostra sonda no detectés el fag, en realitat no podem saber-ho.

Per als vins 11 i 12 es va obtenir senyal d'hibridació, encara que els percentatges eren baixos: el nombre de soques lisogènics era del 15% de la població bacteriana. Això fa que d'una banda, el nombre de fags induïts sigui possiblement molt baix i no el podem detectar, per altra banda és possible que la nostra soca indicadora no sigui sensible per aquests fags.

Per posar-los en evidència hauríem de provar altres soques per tal de trobar-ne alguna que fos sensible.

Com podem veure els fags són presents quasi be sempre en el vi com partícules fàgiques lliures, sense que això comporti un mal funcionament de la FML. Aquests fags provenen de la inducció espontània de les soques lisogèniques. Aquest és un fenomen normal, com veiem en la majoria de vins analitzats, els fags hi són presents, encara que en quantitats relativament baixes. De fet el test de la presència de fags en el vi no es pot considerar com a prova de dificultats en la FML.

3.8.3 - Inoculació del vi amb una preparació industrial de *Leuconostoc oenos*

Des de fa molt temps s'ha intentat controlar el desenvolupament de la FML. Això es important en els vins en què és difícil que comenci espontàniament. La inoculació d'un vi amb una preparació de bacteris làctics produïts industrialment permet d'assegurar el desenvolupament de la FML i de triar el momenten que es vol fer sense necessitat d'esperar a que es comenci espontaniament. Aquest procediment, per tant, es utilitzable en vins amb problemes de FML i en vins que no presenten problemes però en els quals es vol induir la FML rapidament per poder embotellar sense problemes. Això es el que es va fer en un assaig de microvinificació en 25 litres. El vi va ser sembrat amb la soca LOD004. Aquesta soca ha estat adaptada per ser inoculada directament en el vi sense necessitat de reactivació. La selecció de la soca LOD004 va ser feta d'entre una col.lecció de soques provinents de diferents països europeus, en els laboratoris de l'empresa Christian Hansen's Laboratorium dins el marc del programa ECLAIR, en base a la supervivència de la soca dins el vi i la seva capacitat de degradar completament i ràpidament l'àcid màlic. El fet que aquesta soca

contingui un profag pot ser, en certa manera, avantatjós. Aquest fet li dona resistència als fags que són semblants, protegint la soca de la infecció. Un altre avantatge és que el fag ens pot servir de marcador per seguir la supervivència de la soca dins el vi.

La implantació de la soca sembrada és una qüestió que encara no s'ha pogut verificar, la dificultat per poder diferenciar les soques entre elles impedeix de saber si, en una cuba inoculada amb bacteris industrials, la FML es fa per la soca sembrada degut a la seva implantació, o bé hi ha també la flora indígena que hi participa.

Aprofitant el fet que la soca LOD004 és lisogènica es va induir el fag per tal de determinar el perfil de restricció del seu DNA. Aquest ens permetrà de reconèixer el fag entre d'altres fags diferents i per tant caracteritzarà també al bacteri que el conté.

En base a aquest raonament es va intentar determinar, després d'inocular un vi amb la soca LOD004, la proporció de bacteris que contenen el fag Φ LOD004, integrat en el DNA de la soca inoculada i el perfil de restricció dels fags aïllats en aquest vi.

La soca LOD004 va ser sembrada directament en el vi després de la fermentació alcohòlica. Al cap de 10 dies després de la inoculació, quan la FML estava quasi acabada es va agafar una mostra de vi per recuperar els fags lliures i els bacteris presents en aquest moment.

Els bacteriòfags van ser recuperats a partir de plaques de lisi i multiplicats sobre la soca D31.2 en un volum de 500 ml de MRS. Es va extreure el DNA i es va procedir a una digestió amb l'enzim de restricció *Eco* RI dels 10 clons recuperats per veure si el seu perfil coincidia amb el perfil de Φ LOD004 integrat dins el bacteri.

El procediment seguit per l'anàlisi dels bacteris va ser una mica diferent. Es van recuperar 10 colònies a partir de la sembra del vi en medi sòlid, de les quals es va extreure el DNA. Dos dels clons van donar una quantitat molt petita de DNA, insuficient per fer una restricció. Així doncs el DNA de 8 clons va ser digerit per l'enzim *Eco* RI i separades les bandes en gel d'agarosa. El DNA va ser transferit sobre membrana de niló pel mètode de Southern i hibridat amb la sonda obtinguda a partir del DNA de Φ LOD004 marcat amb α ^{32}P . La quantitat de sonda utilitzada va ser de 100 ng en 10 ml de solució d'hibridació.

La digestió del DNA fàgic per l'enzim de restricció *Eco* RI ens va donar dos perfils diferents (Figura 3.21), un perfil clarament majoritari que es repeteix en 7 de les pistes (n. 2 a la n. 8) on en la pista 1 i 9 el DNA està degradat i no podem determinar el perfil. En la pista n.º 10 el perfil es diferent als anteriors, tractant-se doncs d'un altre fag.



**ESTUDI DE LA LISOGÈNIA DE *LEUCONOSTOC OENOS* I
INCIDÈNCIA DELS BACTERIÒFAGS SOBRE LA
FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA DEL VI.**

Memòria presentada per
MONTSERRAT POBLET ICART
per optar al grau de Doctora en Ciències Químiques

Tarragona, Setembre de 1994

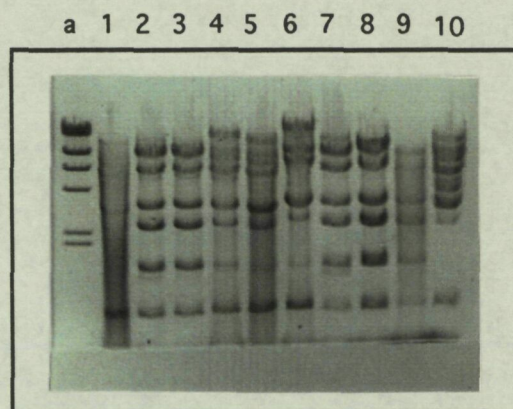


Figura 3.21 : Perfils de restricció obtinguts per la digestió amb *Eco* RI del DNA fàgic provenent de fags aïllats del vi.

a: marcador de pes molecular, DNA de λ tallat per *Hind* III.

El fet d'obtenir un perfil clarament prioritari fa pensar que en el vi hi haurà una gran majoria de bacteris de la mateixa soca i un petit percentatge de soques diferents. Si comparem els perfils d'aquests fags amb el perfil de Φ LOD004 veiem que aquest correspon exactament al perfil majoritari obtingut a partir dels fags del vi.

Aquest primer resultat va ser realment molt interessant. Si el perfil majoritari correspon al profag de la soca LOD004 podem pensar que aquesta soca és majoritària en el vi i per tant que hem aconseguit una bona implantació de la soca. Podem anar encara més lluny en la nostra discussió dient que no hi ha dubte que la FML ha estat feta per la soca inoculada i no per la flora indígena ja que el nombre de cèl.lules és molt més gran.

Per verificar això ho podem contrastar amb els resultats obtinguts a partir dels fags del *Château L* on hi podiem veure diferents perfils, lluny de la uniformitat que hem trobat en aquest últim cas.

En aquest experiment es van analitzar les diferents soques bacterianes obtingudes del vi en el mateix moment que els fags. Després de l'extracció del DNA bacteriana es va fer una digestió amb l'enzim *Eco* RI. D'aquesta manera, si aquestes soques contenen el fag Φ LOD004, obtindrem les mateixes bandes que quan fem la digestió únicament del DNA fàgic.

Per verificar la presència d'aquestes bandes es va transferir el DNA digerit a una membrana de nilò per la tècnica de Southern i es va hibridar amb una sonda construïda amb el DNA del fag Φ LOD004. La sonda es va obtenir marcant 100 ng del DNA fàgic amb ^{32}P i hibridant en les condicions descrites en el capítol de Materials i Mètodes.

De les 8 soques que s'ha extret el DNA (Figura 3.22), podem veure que 4 d'entre elles hibriden amb la sonda donant un perfil idèntic al del fag Φ LOD004 (pistes 1, 3, 4, i 6). En dues soques no obtenim senyal d'hibridació (pistes 5 i 6), la qual cosa fa pensar que es tracta de soques no lisogènics i que pertanyen a la flora indígena. També hi ha una soca

(pista 2) en la qual no és pot observar una clara hibridació i per tant no podem dir res. Finalment, per una de les soques, el perfil es diferent a la resta (pista 8), i aquest correspondria a un altre fag encara que no és gaire neta. Les bandes no s'aprecien gaire be degut a que la senyal d'hibridació no es gaire neta però podem deduir que el perfil es pròxim o igual al que trobem en la pista 3 de la figura 3.14. Aquesta soca podria ser doncs l'origen del fag que presentava un perfil diferent a la LOD004 i que formaria part de la flora indígena.

El 50% de les soques presenten un perfil idèntic al del fag Φ LOD004 la qual cosa fa pensar que es tracta de la soca inoculada que s'ha implantat bé.

3.8.4 -Aïllament de fags en vins amb problemes durant la fermentació malolàctica

Durant les vinificacions de 1992 es van presentar problemes per al desenvolupament de la FML en el *Châteaux C* (denominació de Medoc, regió de Bordeus).

Després de la fermentació alcohòlica, la qual es va fer amb normalitat, es va trasvasar el vi a les botes esperant que la FML es comencés. A finals del mes de gener encara no havia començat tot i que les condicions de temperatura eren les òptimes, ja que la temperatura del celler no va baixar dels 20 °C.

El problema va ser més seriós quan en algunes cubes la FML es va parar repentinament poc temps després de haver començat i per a la resta de cubes ni tan sols va arribar a començar, cosa que indicava que hi havia realment un problema. Quan es va analitzar l'àcid màlic es va veure que no s'havia consumit, la qual cosa indicava una absència de l'activitat bacteriana. El comptatge de bacteris en les diferents cubes ens va confirmar que no hi havia desenvolupament de la flora làctica. Els valors observats oscil·laven entre 10^3 - 10^4 cel/ml en les diferents cubes i per tant el nombre de bacteris era insuficient per assegurar la degradació de l'àcid màlic. El que calia saber era si l'absència de bacteris làctics era deguda a l'acció dels bacteriòfags o simplement si el seu creixement era impedit per les condicions ambientals.

Es va agafar una mostra de cada una de les cubes per fer un comptatge de fags pel mètode habitual sobre la soca D31.2. Les mostres es van analitzar 24 hores després de ser agafades, durant aquest temps es van guardar a 19°C, i no van ser filtrades fins al moment de fer el comptatge.

Els resultats es mostren en la taula 3.15 on podem veure el origen de les mostres i els resultats del comptatge.

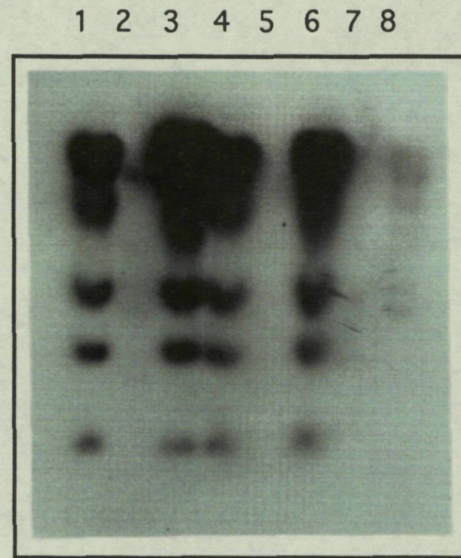


Figura 3.22 : Resultat de la hibridació entre el DNA de les soques aïllades del vi, amb el DNA del profag Φ LOD004 marcat amb ^{32}P .

Taula 3.15: Condicions de emmagatzament del vi en el moment de la FML i varietat de la qual prové. Nombre de fags trobats en cada cuba en UFP/ml

Cuba nº	Recipient del vi durant la FML	Varietat de raïm (a)	UFP/ml
1	Bóta	CS	1.10 ³
2	Bóta	CS	1,7.10 ³
3	Bóta	M	1,8.10 ⁴
4	Bóta	M	1,6.10 ²
5	Bóta	M	9.10 ¹
6	Bóta	M	2.10 ¹
7	Cuba	M	5,5.10 ⁵

(a): CS: Cabernet Sauvignon, M: Merlot

Podem observar que el nombre de fags és variable entre les cubes pero en totes elles i són presents. En la cuba 3 i en la 7 el nombre es considerablement elevat en relació a la resta i en comparació al que havíem trobat fins ara en altres vins analitzats, la qual cosa podria fer pensar que els fags són efectivament la causa de la pèrdua en la població de bacteris.

Aquest vi va ser rapidament inoculat amb la soca LOD 004 per intentar iniciar la FML ràpidament. La fermentació va començar després de la inoculació i es va perllongar durant tres setmanes.

Durant la FML es van prendre mostres de vi per fer una detecció de la presència de fags i veure si coincidia amb el perfil de Φ LOD004.

Caracterització dels fags aïllats

Les plaques de lisi observades en els comptatges de les diferents cubes tenien un aspecte molt semblant entre elles; eren clares, els límits nets i el diàmetre entre 2,5 - 3 mm.

De cada un dels comptatges fets per les diferents cubes es van recuperar dues plaques de lisi a l'azar, les quals van ser inoculades sobre la soca indicadora amb la finalitat de multiplicar els bacteriòfags i conèixer una mica més el seu comportament.

a) Multiplicació dels fags aïllats:

Les plaques de lisi van ser inoculades a 10 ml d'un cultiu de 24 hores. Es va incubar durant 30 hores obtenint un lisat complet per tots els fags. Aquest lisat va ser utilitzat per infectar un altre cultiu de bacteris per tal d'augmentar el nombre de fags. La multiplicació es va repetir fins a 5 vegades sense presentar problemes en cap moment. La capacitat de multiplicació dels fags aïllats del vi sembla ser més elevada que en els fags induïts amb els quals treballavem fins ara.

b) Determinació del seu espectre d'hoste

L'espectre d'hostes ens mostrava la capacitat d'infecció d'aquests fags sobre altres soques de bacteris. Utilitzant el test de la gota es va determinar la capacitat de cada un dels fags a formar zones de lisi sobre un tapís bacterià (Taula 3.16).

Les soques utilitzades en el test han estat seleccionades en el marc del programa ECLAIR a fi de ser inoculades en el vi i assegurar la FML.

Taula 3.16: Espectre d'hostes dels diferents fags aïllats d'un vi amb problemes de FML.
 La capacitat infectiva dels fags s'ha provat sobre diferents soques de bacteris.

Fags	soca bacteriana				
	LOD017	LOD019	LOD021*	LOD023	D 31.2
ΦC1.1	C	C	T	C	C
ΦC1.2	C	C	C	T	C
ΦC2.1	C	C	C	C	C
ΦC2.2	C	C	C	C	C
ΦC3.1	C	C	T	C	C
ΦC3.2	C	C	C	C	C
ΦC4.1	T	C	C	C	C
ΦC4.2	C	C	C	C	C
ΦC5.1	T	C	C	T	C
ΦC5.2	T	C	C	T	C
ΦC6.1	C	C	T	C	C
ΦC6.2	C	C	C	T	C
ΦC7.1	T	C	C	C	C
ΦC7.2	C	C	C	C	C

C: plaques de lisi clares o transparents

T: plaques de lisi tèrboles

*: soca lisogènica

Totes les soques provades són sensibles als fags provinents del vi, posant en evidència una gran capacitat infectiva. Les plaques de lisi observades presenten dos aspectes diferents, algunes són completament clares i d'altres no són completament netes, ja que la placa de lisi està colonitzada per una sèrie de colònies minúscules capaces de créixer en presència del fag.

c) Hibridació DNA fàgic -DNA fàgic

Els fags que s'han trobat en el vi provenen, sense cap dubte, dels bacteris lisogènics existents en la flora indígena. Per veure si el DNA de aquests fags aïllats del vi són semblants als fags de la col·lecció es va fer una hibridació en *dot-blot*. Els 14 fags van ser hibridats amb 4 sondes obtingudes a partir dels fags de la colecció. Les quatre sondes van ser marcades pel mètode de la digoxigenina. Els resultats es mostren en la Taula 3.17.

La hibridació en *dot-blot* ens dóna únicament una idea de la semblança entre els fags. Si són realment molt diferents no hi haurà senyal d'hibridació, i per altra banda, si obtenim senyal d'hibridació podem assegurar que són molt semblants o bé idèntics. El que no podem és veure les petites diferències.

El nostre cas obtenim una hibridació positiva entre tots els DNA la qual cosa confirma la seva semblança. El fet de què els DNA siguin semblants entre ells es interessant perquè ens permet construir les sondes amb el DNA dels fags induïts, el qual podem obtenir amb relativa facilitat.

Taula 3.17: Resultats de les hibridacions entre els DNA dels fags aïllats dels vins i les sondes de la colecció.

Sondes	DNA dels fags aïllats del vi						
	C1.1	C2.1	C3.1	C4.1	C5.1	C6.1	C7.1
DV40.4	+	+	+	+	+	+	+
DV43.1	+	+	+	+	+	+	+
DA39.3	+	+	+	+	+	+	+
LOD019	+	+	+	+	+	+	+

Sondes	DNA dels fags aïllats del vi						
	C1.2	C2.2	C3.2	C4.2	C5.2	C6.2	C7.2
DV40.4	+	+	+	+	+	+	+
DV43.1	+	+	+	+	+	+	+
Da39.3	+	+	+	+	+	+	+
LOD019	+	+	+	+	+	+	+

d) Diferenciació per el perfil de restricció del DNA:

Les extraccions de DNA es van fer a partir d'un lisat de 100 ml, i es va quantificar el DNA del qual se'n van obtenir entre 150 i 200 ng/µl resuspesos en 10 ml finals. S'en van digerir 800 ng amb 10 unitats de l'enzim *Eco* RI. El temps de digestió va ser de 8 hores.

Els perfils de restricció obtinguts dels diferents clons es mostren en la Figura 3.23. A primer cop de vista es pot veure una gran uniformitat en els diferents perfils. Mirant més en el detall podríem assegurar que es tracta del mateix perfil en tots els casos, i que les diferències en algunes bandes vindrien de la digestió parcial del DNA. El perfil que observem coincideix amb el perfil del fag Φ LOD004 cosa que prova que hi ha hagut una colonització de la soca inoculada. Podem verificar doncs, per segona vegada, que en el medi trobem els fags induïts per la soca LOD004. Els perfils demostren que no hi ha un altre fag en el vi o que hi és en molt petita quantitat.

El perfil obtingut no corespon amb cap dels perfils observats en els fags provinents del *Château L*.

3.8.5 -Següiment de la presència de fags durant la vinificació en un *chateau* de la regió del Medoc

La existència de partícules fàgiques en el vi durant la FML ha estat verificada després de posar-los en evidència amb la nostra soca indicadora.

El que ens interessa ara és saber en quin moment apareixen, si coincideix amb el desenvolupament de la flora làctica i concretament de *L. œnos* i quant de temps sobreviuen en les dures condicions del vi durant tot el procés de vinificació. Això potser ens permetrà de preveure i combatre els seus efectes.

Durant les vinificacions de 1993 es va fer el següiment del procés de vinificació en *chateaux* H de la regió de Bordeus. Tres cubes van ser controlades desde el moment de l'entrada del raïm fins al final de la FML, abans del sulfitatge i d'embotellar-lo. Durant tot aquest temps es van agafar mostres del vi, les quals van ser analitzades per verificar la presència de fags, el desenvolupament de la flora làctica i la degradació de l'àcid màlic.

El desenvolupament dels bacteris làctics es produeix després de la fermentació alcohòlica, quan les condicions són més favorables. Aquesta flora làctica es transforma quasi exclusivament en un cultiu massiu de *L. œnos* degut a què les condicions de pH impedeixen el creixement de les altres espècies. Així doncs, es d'esperar que la presència de fags estarà directament relacionada amb la presència de bacteris en el medi si suposem que els fags provenen dels bacteris lisogènics.

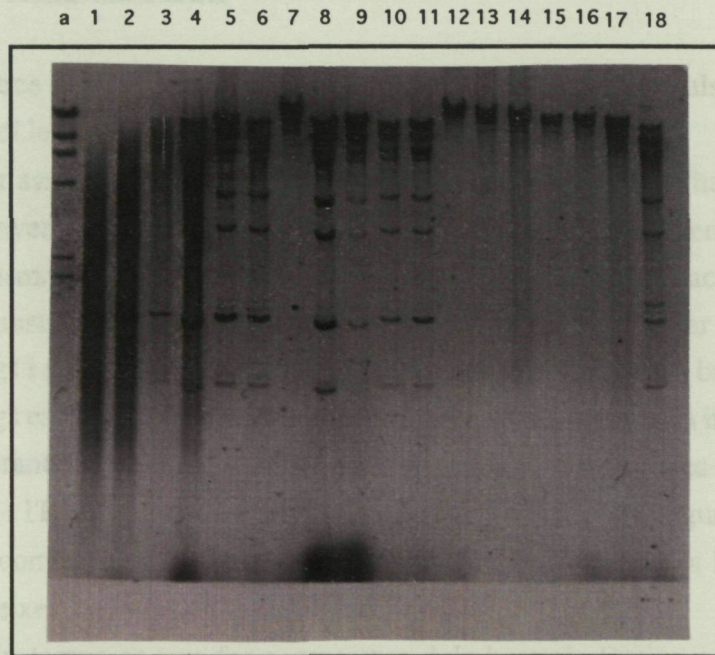


Figura 3.23 : Perfils de restricció dels fags aïllats en el *château C* i digerits per *Eco RI*. En les pistes 1, 2, 3, 4 i de la 12 a la 17 els DNA estan degradats. En les altres pistes es pot observar sempre el mateix perfil.

a: marcador de pes molecular, λ *HindIII*

La determinació de la presència de fags al mateix temps que els bacteris ens va servir per fer la verificació.

Descripció de l'experiència

Les mostres de vi van ser agafades de 3 cubes diferents les quals contenien el most obtingut de parcel·les situades a diferents llocs de la propietat.

El primer assaig per a la determinació de la presència de fags s'ha fet en el most dos dies després d'haver entrat el raïm a la cuba. Més tard i durant la fermentació alcohòlica es van prendre dues mostres més, una al començament i l'altra al final. En acabar la fermentació alcohòlica les mostres es van prendre més sovint per poder determinar el moment en que apareixen els fags i si aquest coincideix amb el desenvolupament de les bacteris làctiques. El comptatge de fags es va fer pel mètode habitual de la doble capa i la soca indicadora utilitzada és la D 31.2. Durant els primers comptatges es van utilitzar dues soques sensibles, la nostra soca indicadora i l'EFA24 per augmentar les possibilitats de trobar algun bacteriòfag. Més tard i abans de començar la FML es va continuar només amb la soca D 31.2 degut a les dificultats de creixement que l'EFA24 presentava.

Al mateix temps es van fer comptatges dels bacteris làctics per poder comparar després amb la presència de fags en el medi. Els bacteris es van començar a comptar a partir del moment en què es va fer el sangrat, abans de començar la fermentació malolàctica. El seguiment de la FML es va fer mesurant la desaparició d'àcid màlic.

Per al comptatge dels bacteris làctics les mostres de vi han estat analitzades el mateix dia en què s'han pres. El medi de cultiu utilitzat és el Dubois+vi ja que el que ens interessa es determinar al màxim el nombre de bacteris vius. Existeix una lleugera diferència entre el nombre de bacteris efectivament vius dins el vi i el nombre que es poden desenvolupar en un medi nutritiu per donar una colònia. El medi DV ens ha permès acostar-nos més a les condicions que existeixen en el vi.

La entrada del raïm a les cubes es va fer entre el 17 i el 20 de setembre de 1993. Des d'aquest moment fins al sangrat del vi a les barriques, es van prendre 10 mostres de les quals es va fer la determinació de la presència de fags sense obtenir en cap cas la confirmació de la seva existència.

Després del sangrat es va començar a analitzar la desaparició de l'àcid màlic i a fer el comptatge de bacteris al mateix temps que dels bacteriòfags. Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 3.24

Per les tres cubes la població làctica va començar un creixement exponencial després del sangrat i a partir del moment en que s'arriba a una població de 10^6 bacteris/ml la FML comença, arribant, en menys de 15 dies, a consumir quasi totalment l'àcid màlic.

Comparant l'aparició dels fags amb la presència de bacteris (Figura 3.25) veiem que hi ha una relació directa, a mesura que el nombre de bacteris augmenta, el nombre de partícules fàgiques es fa present. Contràriament però a aquest comportament exponencial bacterià, la quantitat de fags es manté quasi constant durant tota la fermentació. Quan el nombre de bacteris comença a disminuir observem també una lleugera disminució de partícules fàgiques.

Les titulacions obtingudes són molt semblants en les tres cubes, la qual cosa es compren si tenim en compte que la població bacteriana es del mateix ordre.

Els bacteriofags, en cap cas, eliminen o fan disminuir la població de bacteris, la seva presència es demostra estar associada a la de la flora làctica pero sense impedir ni el seu creixement ni el seu funcionament, els bacteris no son, en principi infectats a gran escala. En la taula 3.18 es mostren els comptatges de fags al llarg del seguiment de les tres cubes.

Taula 3.18: Comptatges de fags en UFP/ml durant el seguiment de les tres cubes desde el most fins després de 42 dies del començament de la FML.

	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3
Comptatges en el most i fins al final de la FA.	absència	absència	absència
Comptatges desde el final de la FA fins al sangrat.	absència	absència	absència
sangrat: dia 0	absència	absència	absència
10 dies després	ND	ND	$9 \cdot 10^1$
14 dies	$1 \cdot 10^2$	ND	$5 \cdot 10^2$
17 dies	$5 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^2$
22 dies	$6 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^2$	$9 \cdot 10^2$
24 dies	$6 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^2$
26 dies	$6 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^2$
32 dies	$6 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^2$
36 dies	ND	$5 \cdot 10^1$	$8 \cdot 10^1$
42 dies	$6 \cdot 10^2$	$3,2 \cdot 10^1$	ND

ND: no determinat

FA: fermentació alcohòlica.

Resultats: recerca bacteriòfags en el vi

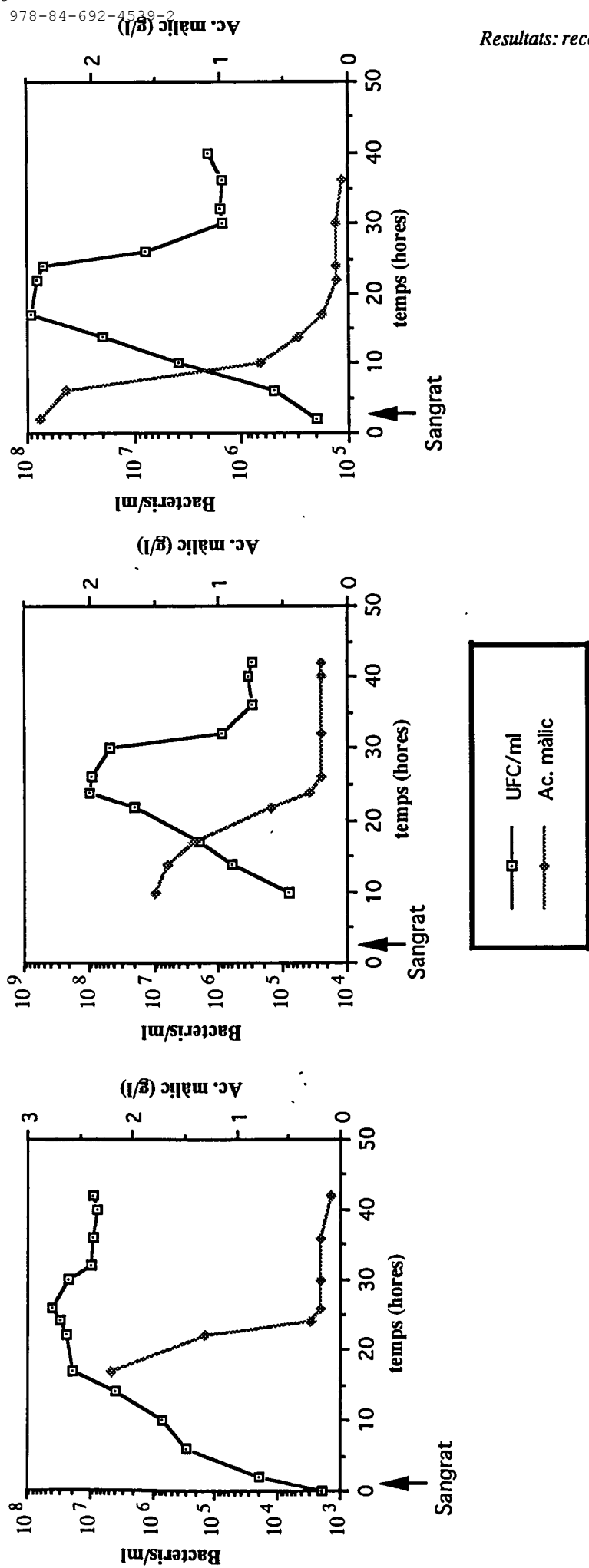


Figura 3.24 : Comptatge de bacteris en UFC/ml des de el moment del sangrat i quantificació del àcid màlic en g/l.

Resultats: recerca bacteriòfags en el vi

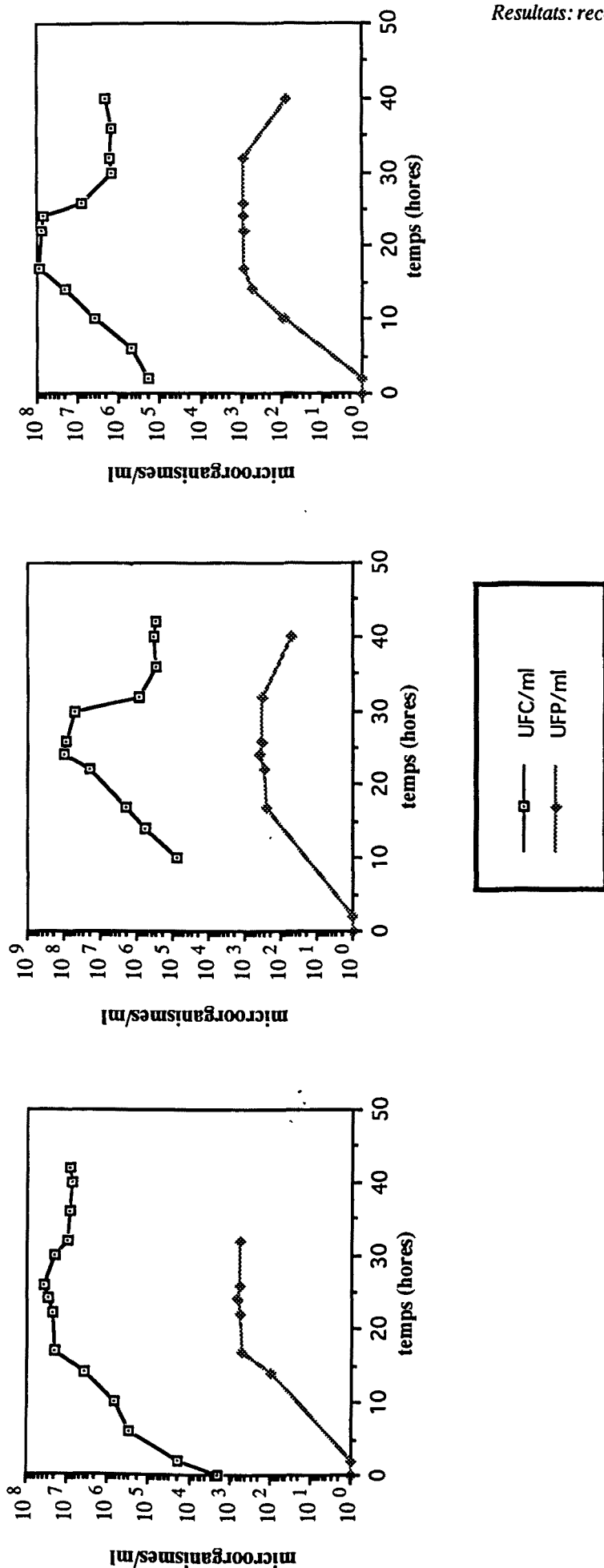


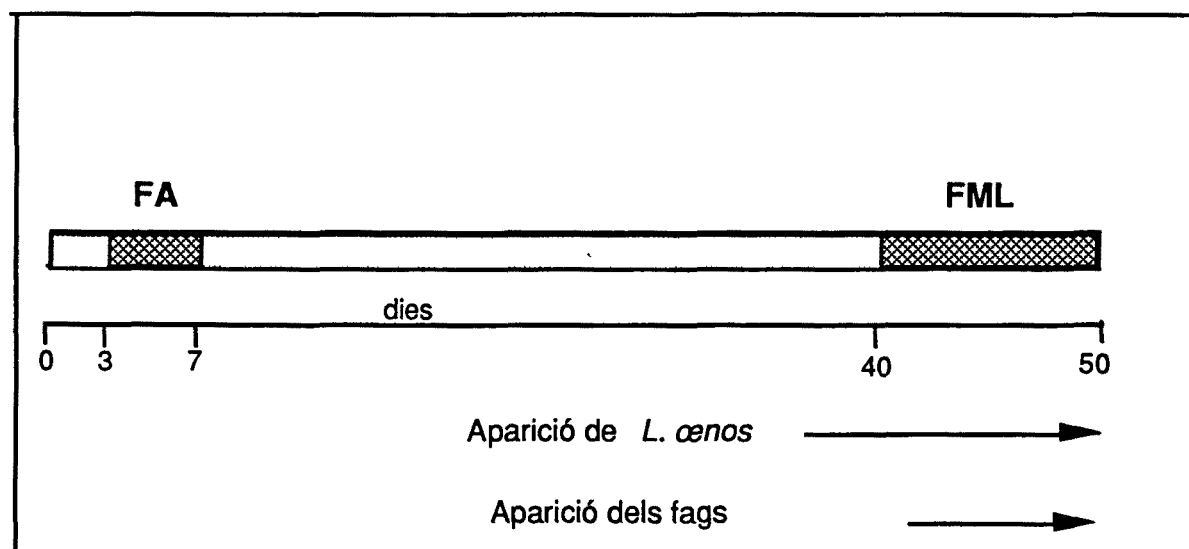
Figura 3.25 : Quantificació de fags en UFP/ml comparat amb la quantificació de bacteris en UFC/ml desde el moment del sangrat fins al final de la FML.

Com veiem a les Figures 3.24 i 3.25 els en tres casos trobem l'exemple classic de fermentació malolàctica. La degradació d'àcid màlic es ràpid a partir del moment que el nombre de bacteris arriba a 10^6 bact/ml.

Pel que respecta al desenvolupament de partícules fàgiques lliures en el vi. La seva aparició es produeix quan la població de bacteris làctics supera 10^6 bact/ml, i provindrien de la inducció espontànea de *L. oenos*.

La presència de fags en el vi està estretament lligada a la presència de bacteris làctics i concretament de *L. oenos*. això confirma el fet de què els fags provenen de la inducció dels bacteris làctics. Es d'esperar doncs trobar-ne només durant la fermentació malolàctica (Figura 3.26).

Figura 3.26: Esquema de la durada de les fermentacions i el moment d'aparició de bacteris i fags.



3.8.6 - Implicació dels fags en les parades de la fermentació malolàctica dels vins

La implicació directa dels bacteriòfags en les dificultats per desenvolupar la FML en alguns vins no ha pogut ser demostrada realment. La presència de fags en el vi es un fenomen corrent tal com hem pogut veure. No obstant, podria ser cert que, com passa en el medi de cultiu, algunes soques amb molta facilitat d'induir el seu profag podrien provocar una inducció en massa i eliminar la població bacteriana. Això seria poc probable quan la

FML fos deguda a la flora indígena perquè encara que hi podria haver una soca majoritària que induís el seu profag, és molt possible que hi haguessin diferents soques que podrien assegurar el desenvolupament de la FML.

Un altre cas seria si els bacteriòfags alliberats per una soca determinada es poguessin multiplicar sobre altres soques sensibles de la població indigena i així eliminar la totalitat dels bacteris. El vi però es un medi hostil i no sabem si seria possible que el fag seguís el seu cicle de multiplicació ni si seria capaç de sobreviure molt de temps com a partícula fàgica lliure.

Per conèixer millor el comportament del fag dins del vi es va fer un assaig inoculant en 10 ml de vi la soca LOD004, al mateix temps, vam infectar el vi inoculant-hi el fag Φ 1T10 aïllat del vi i capaç de lisar la soca LOD004 segons l'espectre d'hostes obtingut.

Quatre tubs de 10ml de vi negre filtrat van ser sembrats amb la soca LOD004 i amb diferents quantitats de fags. El vi no va ser suplementat amb CaCl_2 .

Tub 1= control (solament els bacteris)

Tub 2= bacteris+fags (proporció fags/bacteris=100)

Tub 3= bacteris+fags (proporció fags/bacteris=10)

Tub 4= bacteris+fags (proporció fags/bacteris=1)

Els tubs es van incubar durant 4 dies a 25°C. Cada 24 hores es va fer un comptatge de bacteris, de fags i una anàlisi de l'àcid màlic. El comptatge de fags es fa sobre la soca D31.2. Els resultats es mostren en la Taula 3.19:

Taula 3.19: Resultats obtinguts de la inoculació de la soca LOD004 en el vi i la seva infecció amb el fag Φ 1T10. La proporció fags/bacteris varia en els tres tubs: 100,10,1.

temps (dies)	tub 1: f/b=100			tub 2: f/b=10			tub 3: f/b=1			tub control		
	bact/ ml	UFP/ ml	AM g/l	bact/ ml	UFP/ ml	AM g/l	bact/ ml	UFP/ ml	AM g/l	bact/ ml	UFP/ ml	AM g/l
0	1,610 ⁵	nd	2,7	1,410 ⁵	nd	2,7	1,910 ⁵	nd	2,7	410 ⁴	nd	2,7
1	1,710 ⁵	0	nd	1,610 ⁵	0	nd	2,410 ⁵	0	nd	210 ⁵	0	0
2	1,710 ⁵	0	nd	1,610 ⁵	0	nd	nd	0	nd	1,710 ⁵	0	0
3	1,110 ⁶	0	nd	7,510 ⁵	0	nd	7,210 ⁵	110 ³	nd	310 ⁵	1102	0
4	1,210 ⁶	0	2,4	1,310 ⁶	0	2,5	1,710 ⁶	0	2,5	210 ⁶	0	2,5

nd: no determinat

AM: àcid màlic

La presència de fags és quasi inexistent durant els quatre dies de comptatge. En principi el resultat és incoherent perquè al menys esperem trobar una part dels fags que hem inoculat i que no s'haurien adsorbit però veiem que al cap de 24 hores d'haver inoculat no trobem cap partícula fàgica lliure. Podríem pensar que els fags estan tots adsorbit però és difícil que en un volum tan gran es puguin adsorbir tots. Al cap de 48 hores no hi ha cap senyal de l'aparició de fags multiplicats sobre el bacteri LOD004 que, d'altra banda, és sensible al fag i capaç d'actuar com a hoste. Serien doncs les condicions del vi que impedeixen la multiplicació del fag.

Curiosament en un dels tubs infectats i en el tub control apareixen alguns fags al cap de 3 dies després de la infecció. Aquests fags en realitat no poden venir de la multiplicació ja que si no els hauríem trobat en els quatre tubs. Contràriament pensem que venen de la inducció espontània de la soca LOD004 per dues raons: la primera perquè la quantitat de fags trobats és relativament baixa i la segona i principal perquè els fags s'han trobat en el tub control, en aquest els fags només poden venir de la inducció espontània dels bacteris. Aquest tipus d'inducció es produeix de forma aleatòria quan el nombre de bacteris arriba als voltants de 10^6 cel/ml, però no coneixem encara el mecanisme que el fa començar. Ara ens podem plantejar la qüestió de si els fags es poden multiplicar dins el vi. En aquesta experiència no en tenim cap prova.

Per altra banda veiem que els bacteris creixen normalment sense veure's afectats per la presència dels fags. La quantificació de l'àcid màlic ens confirma l'activitat dels bacteris, ja que la seva desaparició és feble, la qual cosa és normal donat que la població bacteriana es inferior a 10^6 bact/ml.

Veiem doncs que l'activitat bacteriana no es veu afectada per la presència dels fags. Aquest fet ens va fer pensar en que les partícules fàgiques no podien "sobreviure" en el vi ni efectuar el seu cicle de multiplicació, per tant la detecció de fags en el vi és deguda a la inducció espontània constant dels bacteris.

Per verificar que els fags no es mantenen actius en el vi es van analitzar diferents vins en els quals hi trobavem la presència de fags. Quan incubem durant 48 hores una mostra de cada un dels vins i una mostra del mateix vi però filtrat, podem veure que en el vi no filtrat hi continuem trobant partícules fàgiques, i en canvi en el vi filtrat no s'en poden trobar.

Es evident que els profags que detectem provenen de la inducció espontània dels bacteris, quan els eliminem, les partícules fàgiques desapareixen, és a dir, que les partícules induïdes no poden mantenir-se dins d'el vi massa temps.

No coneixem el factor que inactiva els fags en el vi. La primera cosa que vam pensar va ser que era degut als compostos fenòlics. En un primer assaig molt senzill vam filtrar el vi a través de carbó actiu a fi d'eliminar aquest compost obtenint un vi decolorat i comparar la resposta amb un vi no decolorat.

Vam inocular el fag $\Phi 1T10$ en tres tubs que contenien respectivament 10ml de MRS i 10ml de vi filtrat amb carbó actiu. El vi utilitzat havia estat filtrat abans sobre un filtre de $0,45 \mu\text{m}$ per eliminar els bacteris de la flora indígena. El comptatge de fags es va fer a diferents temps després de la inoculació 10, 30 minuts i a 24 hores. Els resultats es mostren a la taula 3.20:

Taula 3.20: Comptatge dels fags després d'haver inoculat en MRS, vi i vi decolorat (sense compostos fenòlics) a diferents temps, 10 min, 30 min i 24 h.

Temps	MRS (UFP/ml)	Vi (UFP/ml)	Vi decolorat (UFP/ml)
10 minuts	$1,4 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$7,7 \cdot 10^5$
30 minuts	$1,7 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^4$
24 hores	$1,6 \cdot 10^7$	0	0

Els compostos fenòlics i tots els altres compostos que es poden eliminar durant la filtració a través del carbó actiu no tenen cap efecte sobre la inactivació dels fags. Al cap de 24 hores, les partícules fàgiques esdevenen inactives en el vi tant si es tracta de vi decolorat com si no. Hem de buscar una altra causa que expliqui aquesta desaparició. El temps de durada de l'activitat d'un fag en el vi és de menys de 24 hores, es per això que només trobem fags en el vi quan hi han també els bacteris lisogènics que els indueixen constantment.

3.8.7 - Discussió i conclusions

El que s'ha tractat de fer en aquest apartat ha estat la verificació de l'existència de fags en el vi i el seu origen així com la seva supervivència i la seva capacitat de multiplicació. Pel que veiem en els resultats podem confirmar la presència de partícules fàgiques lliures al menys en una gran part de les mostres analitzades

La presència de fags en el vi s'ha confirmat com un fenomen corrent, aquest és degut a la inducció espontània de les soques lisogèniques de *L. oenos*, bacteri responsable de la FML en els vins que nosaltres hem estudiat i per això s'ha treballat amb fags d'aquesta espècie. No obstant, en altres regions vitícoles on les característiques del vi no són les mateixes que a la regió de Bordeus, el bacteri responsable de la FML podria ser un altre i per

tant els fags s'haurien de buscar utilitzant unes altres soques hoste. Aquesta puntualització és important perquè els resultats d'aquest treball 'es refereixen només als vins de Bordeus.

Es cert que hem trobat bacteriòfags en vins problemàtics però no és menys cert que n'hem trobat també en vins que han fet la FML. El nombre de fags pot ser un factor indicatiu de què les soques que formen part de la flora indígena tenen tendència a induir el seu fag i per tant a disminuir lleugerament la població bacteriana però això no explica que la FML no arribi a fer-se. Com hem pogut veure hi han casos en què el nombre de fags és baix i en canvi le FML no es fa. La presència de fags pot influir segurament en dificultar el procés de fermentació, però, en el nostre cas, no podem assegurar que sigui la causa principal.

Un altre punt a verificar és si aquests fags que són lliures en el vi són capaços de multiplicar-se sobre altres soques presents que siguin sensibles, ja que el vi és un medi hostil que no presenta les condicions ideals d'un medi de cultiu.

El que podem assegurar es que la inoculació del vi amb una soca lisogènica no ha plantejat cap problema, contràriament, ha aconseguit fer la FML arribant a implantar-se bé en el vi.

Els fags aïllats en el vi són diferents entre ells, la qual cosa ens indica que provenen d'una flora indígena heterogènia. El cas en què el vi ha estat inoculat amb una soca determinada aquesta esdevé majoritària. Això ho hem pogut comprovar perquè els fags aïllats en aquest vi eren el mateix. Aquest podria ser un bon mètode per seguir l'implantació d'una soca sempre que sigui lisogènica.

El nombre de fags que és troben lliures en els vins analitzats no és molt elevat, ja que no passa la majoria de vegades de 10^2 UFP/ml. Aquests fags venen de la inducció espontània de les soques lisogèniques de *L. oenos*. En alguns dels vins no hem pogut posar en evidència la presència de fags la qual cosa no vol dir necessàriament que no n'hi hagin, solament que no els podem detectar perquè no tenim una soca sensible o bé perquè el nombre de fags és molt petit. En tot cas no creiem que no hi hagin fags en el vi durant la FML perquè, tal com hem vist en el nostre treball, el percentatge de lisogènia a l'espècie *L. oenos* és molt elevada (90%, apartat 3.5).

Els comptatges de fags fets en el château C amb problemes de FML han donat titulacions de fins a 10^5 UFP/ml en una cuba. En aquest cas es pot pensar que la inducció dels fags ha sigut més gran, encara que no coneixem la raó, possiblement el fet que hi han soques que indueixen els fags més fàcilment que d'altres o bé que en un moment donat indueixen massivament el seu profag sigui la raó, i això hauria impedit el desenvolupament normal dels bacteris.

El seguiment de la presència de fags durant tot el procés de vinificació ha permès verificar que els fags apareixen en el moment en que hi ha el desenvolupament bacterià de

l'espècie *L. oenos* i que no se'n poden trobar en cap etapa anterior ja que el nombre de bacteris d'aquesta espècie és massa petit.

Una altra verificació que la presència de fags va associada a la presència de soques lisogèniques és el fet de que la supervivència d'una partícula fàgica en el vi és de menor de 24 h. Passat aquest temps les partícules fàgiques induïdes pels bacteris deixen de ser actives o virulentes dins del vi, per tant la seva presència continuada està sempre associada a la presència de bacteris

El factor inhibidor dels fags no s'ha determinat, pensem però que es tracta o bé de l'alcohol o bé dels compostos fenòlics. Sobre l'acció d'aquests darrers compostos i la seva acció sobre els fags es va fer un experiment, els resultats no concloents del qual insinuen que els compostos fenòlics no inhibeixen els fags.

4 - CONCLUSIONS

1 - S'ha posat en evidència l'estat de lisogènia en 280 soques de *Leuconostoc oenos*, aïllades de vins de Bordeus, per inducció del seus profags amb la mitomicina C, obtenint com a resultat que quasi la meitat de les soques provades contenen un profag. L'obtenció d'aquests bacteriòfags ens ha permès l'estudi de la lisogènia d'aquesta espècie i l'avaluació de la seva importància en les soques industrials.

2 - Els fags induïts d'aquesta manera ens han permès trobar algunes soques de *L. oenos* molt sensibles als fags. Una d'elles (D31.2), ha estat triada com a soca hoste o indicadora de la presència de fags en el nostre estudi.

3 - La utilització de la mitomicina C per a determinar el percentatge de lisogènia en les poblacions indígenes, on el nombre de soques és elevat, no és un mètode ràpid ja que s'ha de tenir en compte la fase de creixement de cada soca. L'efecte de la MC només és visible quan el cultiu bacterià està al començament de la fase exponencial. Si la MC s'addiciona en una fase tardana de creixement no es pot observar la lisi cel·lular donant falsos negatius. Per això quan s'han utilitzat altres mètodes per determinar la lisogènia en les soques de la col·lecció, els percentatges no han estat els mateixos.

4 - Les condicions òptimes de multiplicació dels bacteriòfags en medi de cultiu són les mateixes que les que permeten la multiplicació dels bacteris, pH 4.5 - 5 i una temperatura de 25°C. Un gran nombre de bacteris en el medi permet un gran nombre d'infeccions per part dels fags.

La presència d'ions Ca^{++} en el medi és imprescindible per la infecció fàgica. En les sòques utilitzades s'ha trobat que la concentració òptima perquè la multiplicació sigui màxima és de 25 mM. Les concentracions baixes la disminueixen lleugerament, i les altes concentracions la disminueixen considerablement.

5 - L'absència d'adsorció ha estat provat com a mecanisme de resistència d'alguns bacteris als bacteriòfags però aquest no és l'únic mecanisme donat que hi han soques resistents les quals mostren un percentatge d'adsorció semblant a la de la soca indicadora.

6 - L'obtenció d'una soca resistent mitjançant la selecció de clons que no són afectats per la presència de fags, no ha estat possible. Els bacteris que en un moment donat adquireixen la resistència, perden aquest caràcter al llarg dels sembrats. L'obtenció de soques resistents d'importància industrial haurà de passar per processos de manipulació genètica que puguin fer estable l'adquisició d'aquest caràcter.

7 - L'estudi del DNA fàgic ens ha permès veure que existèixen diferents fags dins la mateixa espècie bacteriana mitjançant l'anàlisi dels fragments de restricció. La tècnica d'hibridació DNA/DNA entre els diferents fags mostra que tots els DNA fàgics hibriden entre ells, malgrat les diferències que s'observen en els seus perfils de restricció la qual cosa ens ha permès construir una sonda amb el DNA fàgic i detectar per hibridació la presència dels fags.

8 - Aquestes sondes han estat utilitzades per la detecció de la lisogènia mitjançant la hibridació amb el DNA cromosòmic de soques de *L. oenos*. En aquest cas hem obtingut un percentatge de lisogènia del 90% en les soques de la col·lecció. Aquest mètode és més ràpid que la utilització de la MC i no depèn de la fase de creixement del bacteri.

9 - La temptativa de lisogenització d'una soca no lisogènica ha mostrat que, si bé podem seleccionar clons que han integrat el DNA fàgic, aquesta integració no és estable, perdent el profag en el curs dels sembrats.

10 - S'ha confirmat l'aparició de partícules fàgiques lliures durant la fermentació malolàctica d'alguns vins, cosa que coincideix amb el desenvolupament de la flora làctica del vi i responsable de la FML. Els fags provenen de la inducció espontània dels bacteris lisogènics però no s'ha pogut demostrar que es puguin multiplicar dins del vi, ja que la seva activitat com a partícula fàgica infectiva dins d'aquest medi no passa de les 24 hores. La presència de fags dins del vi no presenta una relació directa amb dificultats de la FML, sinó que més aviat es tracta d'un fenomen corrent quan la flora indígena té un gran percentatge de bacteris lisogènics.

5 - BIBLIOGRAFIA

- Accolas J.P., H. Spillman (1979), The morphology of six bacteriophages *Streptococcus thermophilus*. Appl. Bacteriol. 47, 135-144.
- Adams M.H. (1959). Bacteriophages. New York: Wiley Intersciences, 463.
- Amachi T., S. Imamoto i H. Yoshizumi (1971). A growth factor for malo-lactic fermentation bacteria. Agr. Biol. Chem., 35, 8, 1222-1230.
- Anderson D.G. i L.L. McKay (1983). Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. Appl. Environ. Microbiol. 46:549-552.
- Ansanay V., S. Dequin, B. Blondin, P. Barre (1993). Cloning, sequence and expression of the gene encoding the malolactic enzyme from *Lactococcus lactis*. FEBS Lett. 332: 74-80.
- Arendt E.K., Lonvaud A. i Hammes P. (1991) Lysogeny in *Leuconostoc oenos* J. Gen. Microbiol. 137: 2135-2139.
- Arendt E.K. i W.P. Hammes (1992). Isolation and characterization of *Leuconostoc oenos* phages from german wines. Appl Microbiol. Biotechnol. 37: 643-646.
- Baldwin K.A. i McKay L.L.(1987) Spontaneous release of temperate phage by relysogenized lactose-positive transductants of *Streptococcus lactis* C2. J. Dairy Sci.70:2005-2012.
- Beelman R. B. and J. F. Gallander. (1979). Wine deacidification. Adv. Food Res. 25, 1-53.
- Beelman R.B., Gavin III, A. i Keen, R.M. (1977). A new strain of *Leuconostoc oenos* for induced malo-lactic fermentation in eastern wines. Am. J. Enol. Vitic. 28, 159-165.
- Boizet B., M. Mata, O. Mingot, P. Ritzenthaler i T. Sozzi (1992). Taxonomic characterization of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc oenos* bacteriophage. FEMS Microbiol. Lett. 90:211-216.
- Bousbouras G.E. i R.E. Kunkee (1971) Effect of pH on malolactic fermentation in wine. Am. J. Enol. Vitic., 22, 121-126.
- Bousbouras, G.E. i R.E. Kunkee (1971). Effect of pH on malolactic fermentation in wine. Am. J. Enol. Vitic. 22 (3), 121-126.
- Brechot P., J. Chauvet, M. Croson i R. Irrman (1966). Configuration optique de l'acide lactique apparu au cours de la fermentation malolactique pendant la vinification. C.R. Acad. Sci., 262, 1605-1607.
- Bruttin A., B. Marchesini, R.S. Moreton i T. Sozzi (1992) *Staphylococcus carnosus* bacteriophages isolated from salami factories in Germany and Italy. J. Appl. Bacteriol. 73:401-406.
- Budde-Niekietl, A. i M. Teuber (1987). Electron microscopy of the adsorption of bacteriophages to lactic acid Streptococci. Milchwissenschaft 42:551-554.
- Carre, E. (1982) Thèse de 3eme cycle, Université Bordeaux II.

- Castino, M., L. Usseglio-Tomaset i A. Gandini (1975). Factors which affect the spontaneous initiation of the malolactic fermentation in wines. The possibility of transmission by inoculation and its effect on organoleptic properties. In A: lactic acid bacteria in beverage and food, Cerr, J.C., Cutting, C.V., i Whitting, G.C., ed. Acad. Press, London.
- Cavin J.F. (1988). Etude de la flore lactique des vins et de la fermentation malolactique. Aspects physiologiques et technologiques. Thèse d'état es sciences, Université de Dijon.
- Cavin J.F., F.Z. Drici, H. Prevost, i C. Divies (1991) Prophage curing in *Leuconostoc oenos* by mitomycine C induction. Am. J. Enol. Vitic. 42, n^o3.
- Cazells, O. i F. Gnaegi (1982). Enquete sur l'importance pratique du probleme des bacteriophages dans le vin. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 14, 267-270.
- Collins E.B. i F.E. Nelson i C.E. Parmelee. (1950). The relation of calcium and other constituents of a defined medium to proliferation of lactic streptococcus bacteriophage. J. Dairy. Sci. 41:41-48.
- Costello P.J., G.J. Morrison, T.H. Lee, i G.H. Fleet (1983). Number and species of lactic acid bacteria in wines during vinification. Food Technol. Aust., 35, 14-18.
- Coveney J.A., G.F. Fitzgerald i C. Daly (1987b) Detailed characterization and comparison of four lactic streptococcal bacteriophages based on morphology, restriction mapping, DNA homology and structural protein analysis. Appl. Environ. Microbiol. 53:1439.
- Coveney J.A., G.F. Fitzgerald i C. Daly. (1987a) Characterization and comparison of lactic streptococcal bacteriophages. Presented at 7th Int. Congr. Virol. Edmonton, AB, Canada.
- Cox D.J. i T. Heinik-Kling (1989). The malolactic fermentation: a chemiosmotic energy yielding (ATP) decarboxilation reaction. J. Bacteriol. 171:5750-5752.
- Cox D.J. i Heinik-Kling (1990). A comparison of lactic acid bacteria for energy-yielding (ATP) malolactic enzyme system. Am. J. Enol. Vitic. 41: 215-218.
- Craig, D., Neliane, F.; A. Silveira i Graham H. Fleet (1985). Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. Applied and Environmental Microb. p. 872-876.
- Czulak J. D.J. Bant, S.C. Blyth, J.B. Crace. (1979), Dairy Indust. Int. 44: (2), 17.
- Czulak, J. and J. Naylor. (1956). Host phage relationship of cheese starter organisms. J. Dairy Res. 23, 120-133.
- Chalfan, Y., I. Goldberg i R.I. Mareles. (1977). Isolation and Characterization of malolactic bacteria from Israeli red wines. J. Food Sci., 42(4), 939-943.
- Chauvet J.; P. Brechot; P. Dupuy; i C. Dubois (1980). Les acides maliques et citriques peuvent-ils être les substrats permettant la croissance des bacteries malo-lactiques dans le vin, CR Séances Acad. Agric. Fr. 66: 1174-9.

- Chopin A., M. C. Chopin, A. Moillo-Batt i P. Langella. (1984) Two plasmid determined restriction and modification system in *Streptococcus lactis*. Plasmid 11:260-263.
- D'Herelle F.H. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dycenteriques. C.R. Hebd Séances Acad. Sci Fr. (165) 373-375.
- Daniell S.D. i W.E. Sandine.(1981). Development and comercial use of a multiple strain starter. J. Dairy Sci. 64:407-415.
- Davidson,B.E., I.B. Powell i A. Hillier.(1990) A temperate bacteriophages and lysogeny in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol.Rev. 87:79-90.
- Davies G, F.M. Silveira (1985). Occurence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. Appl. Environ. Microbiol., 40, 964-966.
- Davis C., F. Neliane, A. Silveira i G.H. Fleet (1985) Occurence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. Appl. Environ. Microbiol. 872-876.
- Davis, C.R., D. Wibowo, R. Eschenbruch, T.H. Lee, i G.H. Fleet (1985). Practical implications of malolactic fermentation: A review.Am. J. Enol. Vitic. 36: 290-301
- De Klerk H.C. i N. Hugo.(1970) Phage-like structures from *Lactobacillus acidophilus*. J.Gen. Virol. 8: 231-234.
- De Man, J.C., M. Rogosa i M.E. Sharpe (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 23(1),130-135.
- De Vos W.M.; Underwood H.M.i L. Davies (1984). Plasmid encoded bacteriophage resistance in *Streptococcus cremoris* SK11. Fed Eur. Microbiol. Soc. Microbiol. Lett. 23: 175.
- Denayrolles M., M. Aigle i A. Lonvaud-Funel (1994). Cloning and sequence analysis of the gene encoding *Lactococcus lactis* malolactic enzyme: Relationships with malic enzymes. FEMS Lett.116: 79-86.
- Dentan T., T. Sozzi i H. Bauer. (1970) J. Microscopie 9,567.
- Desens C., (1989). Les phénomènes d'inhibition des bactéries lactiques du vin. Relations avec la constitution lipidique des membranes. Thèse de doctorat, mention Oenologie Ampélogie. Université de Bordeaux II, France.
- Di Masi,D.R., J.C. White, C.A. Schnaitman i C. Bradbeer (1973). Transport of vitamin B12 in *E. coli*: Common receptor sites for vitamin B12 and the E. colicins on the outer membrane of the cell envelope. J.Bacteriol.115:506-513.
- Ellis E.L.i Delbrück M. (1939). The growth of bacteriophage. J. Gen. Physiol. 22,365.
- Erskine, J.M. (1970). Effect of spermine on host-cell lysis and reproduction by a lactic streptococcal bacteriophage. Appl. Microbiol. 19: 638-642.
- Ferre, L., (1922). Influence de la retrogradation de l'acide malique sur la composition des vins blancs. Ann. Sci. Agro, 227.

- Flesch P. i B. Holbach (1965) Zum abbau der L-apfelsäure durch milchsäuerbakterien. IV Über die malat-abbauenden enzyme der bakterium "L" unter besonderer berücksichtigung der brenztraubensäure-Decarboxylierung. Arch. Mikrobiol., 58,63-70.
- Fornachon, J.C.M.(1963). Inhibition of certain lactic acid bacteria by free and bound sulphur dioxide. J. Sci. Food Agric., 14, 857-862 .
- Fornachon,J.C.M.(1964). A *Leuconostoc* causing malo-lactic fermentation in Australian wines. Am. J. Enol. Vitic. 15185-6 .
- Fornachon J.C.M. i B. Lloyd (1965). Bacterial production of diacetyl and acetoin in wine. J. Sci. Food. Agric. 19: 374-8.
- Fremaux, Ch.(1990). Thèse de 3eme cicle a l'Universite de Bordeaux .
- Galesloot TH. E. ,F. Hassing i J. Stadhouders (1966). XVIIth Int. Dairi Congr.D,491.
- Garvie, E.I.(1976). Hybridization between doxyribonucleic acids of some strains of heterofermentative lactic acid bacteria. Inst. Syst. Bact., 26, 116-122
- Garvie E.I. (1976) Hybridization between deoxyribonucleic acides of some strains of heterofermentative lactic acid bacteria. Inst J. Syst. Bact., 26, 116-122.
- Garvie, E.I.(1984). Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostoc* from other lactic acid bacteria. Methods in Microbiology. 16, 147-178.
- Gasson, M.J. i F.L. Davies (1980). High frequency conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation. J. Bacteriol.143(3),1260-1264.
- Gnaegi, F. i T. Sozzi (1983). Les bacteriophages de *Leuconostoc oenos* et leur importance oenologique. Bull. O.I.V. 56, 356-357.
- Gnagi F.; O. Cazelles, T. Sozzi i N. D'Amico (1984). Connaissances sur les bacteriophages de *Leuconostoc oenos* et progres dans la maitrise de la fermentation malolactique des vins. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hort. 16, 59-65.
- Hargrove, R.E., F.E. McDonough i R.P. Tittsler (1961). Pospate heat treatment of milk to prevent bacteriophage proliferation in lactic cultures. J. Dairy Sci. 44: 1799-1810.
- Heinick-KlingT., T.H. Lee i D.J.D. Nicholas (1986) Inhibition of bacterial growth and malolactic fermentation in wine by bacteriophage. J. Appl. Microbiol. 61, 287-292.
- Heinick-Kling T., T.H. Lee i D.J.D. Nicholas. (1986). Characterization of the lytic activity of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* from wine. Appl. Bacteriol., 61, 524-534.
- Heinik-Kling, D.J. Cox, E.B. i Olsen (1991). Production de l'energie durant la fermentation malolactique. R.F.Æ. n° 132 sept/oct.
- Helling R.B., H.M. Goodman i H.W. Boyer (1974). Analisis of R. *Eco* RI fragments of DNA from labdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. J. Virol. 14: 1235.

- Higgins A.R. i W.E. Sandine (1977). Incidence and properties of temperate bacteriophages induced from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 785-789.
- Hontebeyrie, M. and F. Gasser, (1975) Comparative immunological relationships of two distinct sets of isofunctional dehydrogenase in the genus *Leuconostoc*. *Inst. J. Syst. Bact.*, 25, 1-6.
- Huggins A.R. (1984). Progress in dairy starter culture technology. *Food Technol.* 38:41-51.
- Huggins A.R. i W.E. Sandine. (1977). *Appl. Environ. Microbiol.* 33,184.
- Huggins, R.A. i E.W. Sandine, (1977). Incidence and properties of temperate bacteriophages induced from lactic Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33,184-191.
- Hull R.R. (1978). Proc. Factory-derived cheese starters meeting (Hull, R.R., Ed) Dairy Research Laboratory, CSIRO, Highett, Victoria, Australia.
- Hull, R.R. i Brooke. (1982). Bacteriophages more active against cheddar cheese starters in unheated milk. *Aust. J. Dairy Technol.* 37:-143-146.
- Hunter, G.J.E. (1943). Bacteriophages for *Streptococcus cremoris*: Phage development at various temperatures. *J. Dairy Res.* 13:136-145.
- Jarvis A.W. (1984) DNA-DNA homology between lactic streptococci and their temperate and lytic phages. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:429-435.
- Jarvis A.W. (1984). Differentiation of lactic streptococcal phages into phage species by DNA-DNA homology. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:343.
- Jarvis A.W. (1987). Sources of lactic streptococcal phages in cheese plants. *NZ Dairy Sci. Technol.* 22: 93-103.
- Jarvis A.W. i H.A. Heap. (1984). Study of lactic streptococcal phages isolated on one starter strain. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* 19:125.
- Jarvis A.W. i J. Meyer. (1986). Electron microscopic heteroduplex study and restriction endonuclease cleavage analysis of the DNA genomes of three lactic streptococcal bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:566.
- Jarvis A.W. i T.R. Klaenhammer. (1986) Bacteriophage resistance conferred on lactic streptococci by the conjugative plasmid pTR2030: effects on small isometric-, large isometric-, and prolate headed phages. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1272-1277.
- Jimeno J., M. Casey, J. Gruskovnjak i M. Fürst (1989). Identifizierung von Milchsäurebakterien. *Schweizerische Milchwiirtschaftliche Forschung* Juni, 89, 18-23.
- Kandler O., J. Winter, K.O. Stetter (1973). Zur Frage der Beeinflussung der Glucosevergärung durch L-Malat bei *Leuconostoc mesenteroides*. *Arch. Microbiol.* 90: 65-75.

- Kelly, W.J., R.V. Asmundson i D.H. Hopcroft (1989). Growth of *Leuconostoc oenos* under anaerobic conditions. *Am. J. Enol. Vitic.*, 40 (4), 277-282 .
- King, S.W. i R.B. Beelman.(1986). Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in model grape juice/wine system. *Am. J. Enol. Vitic.* 37 (1), 53-60..
- Klaenhammer T.R. i R.B. Sanozky (1985) Conjugal transfer from *Streptococcus lactis* ME2 of plasmids encoding phage resistance, nisin resistance and lactose-fermenting ability: evidence for a high frequency conjugative plasmid responsible for abortive infection of virulent bacteriophage. *J. Gen. Microbiol.* 131:1531-1541.
- Kock, 1900. Citat per Waughn R.H., .1955
- Korkes S. i S. Ochoa (1948). Adaptative conversion of malate to lactate and carbon dioxide by *Lactobacillus arabinosus*. *J. Biol. Chem.*, 176, 463-464.
- Korkes S., Del Campillo i S. Ochoa (1950) Biosynthesis of dicarboxylic acids by CO₂ fixation. Isolation and properties of adaptative "malic" enzyme from *Lactobacillus arabinosus*. *J. Biol. Chem.*, 187, 891-905.
- Kozak W.; M. Rajchert-Trzpił; J. Zadjel i W.T. Dobrzanski (1973). Lisogeny in lactic streptococci producing and not producing nisin. *Appl. Microbiol.* 25: 305-308.
- Kunkee, R.E.(1967). Control of malo-lactic fermentation induced by *Leuconostoc citrovorum*. *Am. J. Enol. Vitic.* 18:71-7 .
- Kunkee, R.E.(1967). Malolactic fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.*, 9, 235-279. .
- Kunkee R.E. (1974) Malo-lactic fermentation in wine making. In: *Chemistry of winemaking*. A.D. Webb ed., *Adv. Chem. Ser.* 137, 151-170.
- Kunkee R.E. (1975). A second enzymatic activity for decomposition of malic acid by malo-lactic bacteria in: *lactic acid bacteria in beverages and food*. J.G. Carr, C.V. Cutting i G.C. Whiting (Eds.). 29-42. Academic Press, London.
- Kunkee R.E. , C.S. Ough i M.A. Amerine (1964). Induction of malo-lactic fermentation by inoculation of must and wine with bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.* 15: 178-83.
- Kunkee,R.E., G.J. Pilone, R.E. Combs.(1965). The occurrence of malolactic fermentation in southern California wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 219-232..
- Lafon-Lafourcade S. (1975) Factors of the malolactic fermentation of wines. pp43-53in: *Lactic acid bacteria beverages and food*. J.G. Carr, C.V. Cutting and Withing Ed., Academic press, London.
- Lafon-Lafourcade S. i A. Joyeux (1979). Techniques simplifiées pour le dénombrement et l'identification des microorganismes vivants dans les moûts et les vins. *Conn. Vigne Vin*, 13(4), 295-310.
- Lafon-Lafourcade, S. (1980) *Connaissances actuelles dans la maîtrise de la fermentation malolactique dans les moûts et les vins*.Actualités Œnologiques et Viticoles, Dunod ed., Paris, pp 243-251.
- Lafon-Lafourcade, S. (1983). *Wine and Brandy*. p. 81-163, A: H.J.Rehm and G. Reed (ed) Biotechnology. Verlag Chemie, Weinheim.

- Lafon-Lafourcade, S., E. Carre i P. Ribéreau-Gayon.(1983). Occurrence of lactic acid bacteria during different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:874-80.
- Lafon-Lafourcade, S., i E. Peynaud (1974). Sur l'action antibactérienne de l'anhydride sulfureux sous forme libre et combiné. *Conn. Vigne Vin*, 10 (2), 187-203. .
- Lakshmidēvi G. (1988) Molecular biology of temperate streptococcal phages Ph. D. Thesis University of Melbourne, Melbourne.
- Lakshmidēvi G., B.E. Davidson, A.J. Hillier (1988) Circular permutation of the genome of a temperate bacteriophage from *Streptococcus cremoris* BK5. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1039-1045.
- Lawrence, R.C., T.D. Thomas, B.E. Terzaghi (1976) Reviews of the progress of dairy science: cheese starters. *J. Dairy Res.* 43:141-193.
- Ledford, R.A. i M.L. Speck (1979). Injury of lactic streptococci by culturing in media containing high phosphates. *J. Dairy Sci.* 62: 781-784.
- Lee, A. (1978). Bacteriophages associated with lactobacilli isolated from wine. p. 287-295. In E. Lemperle and J. Frank (ed) *Proceedings of the 5 th International Oenological Symposium*. 13-15 February 1978. Auckland International Association of Modern Winery Technology and Management Breisach.
- Lonvaud-Funel A, A. Joyeux i O. Ledoux (1991). Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 501-8.
- Lonvaud-Funel A. (1986). Recherches sur les bactéries lactiques du vin. Fonctions métaboliques, croissance, génétique plasmidique. Thèse d'Etat ès sciences. Université de Bordeaux II.
- Lonvaud-Funel A. i A.M. Strasser de Saad (1982). Purification and properties of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from grapes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43 (2), 357-361.
- Lonvaud-Funel, M.(1975). Recherches sur les bactéries lactiques du vin. assurant la transformations de malate en lactate. Thèse d'Etat ès Sciences. Université de Bordeaux II.
- Loof, M., J. Lembke i M. Teuber.(1983). Characterization of the genome of the *Streptococcus lactis* "subsp. discetylactis" bacteriophage P008 wide-spread in German cheese factories. *System. Appl. Microbiol.* 4: 413-423.
- Losic R. i P.W. Robins. (1967). Mechanism of E15 conversion studied with a bacterial mutant. *J. Mol. Biol.* 30:445-455.
- Lowrie R.J. (1974). Lysogenic strains of group N lactic streptococci. *Appl. Microbiol.* 27: 210-217.
- Maniatis T., E.F. Fritsch i J. Sambrook (1982). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold spring Harbor Laboratory.

- McKay, L.L. i K.A. Baldwin.(1984). Conjugative 40-megadalton plasmid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* DRC3 is associated with resistance to nisin and bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:68-74.
- Mermelstein, N.H.(1982). Advanced bulk starter medium improves fermentation processes. *Food Technol.* 36:69-76.
- Mullan, M.W.A. (1979). Lactic streptococcal bacteriophage enumeration. A review of factors affecting plaque formation. *Dairy Ind. Int.* 44:11-14.
- Mullan, W.M.A., C. Daly i P.F. Fox (1981). Effect of cheese-making temperatures on the interactions of lactic streptococci and their phages. *J. Dairy Res.* 48:465-471.
- Müller-Thurgau, H.(1891). Über die ergebnisse, neuer untersuchungen auf den gebite der weinbersitung. *Ber. XII Dtsch. Weinbaukong (Worms):* 128 .
- Nel L., B.D. Wingfield, L.J. Van der Meer i H.J.J. Van Vuren (1987). Isolation and characterization of *Leuconostoc oenos* bacteriophages from wine and sugarcane. 44, 63-67.
- Olsen R.H., J.S. Siak i R.H. Gray (1974). Characteristics of PRD1, a plasmid-dependent broat host range DNA bacteriophage. *J. Virol.* 14:689-699.
- Paraskevopoulos Y. (1988). Utilisation des enveloppes cellulaires de levure pour la stimulation de la fermentation malolactique. Interpretation de leur mode d'action.Thèse a l'Université de Bordeaux II.
- Park, C. and L.L. McKay (1975). Induction of prophage in lactic Streptococci isolated from comercial dairy starter cultures. *J. Milk Food Technol.* 38, 594-597.
- Pasteur, L. (1866). *Etudes sur le vin.* Imprimerie Imperiale, Paris.
- Peake, S.E. i G. Stanley. (1978). Partial characterization of a bacteriophage of *Lactobacillus bulgaricus* isolates from yogurt. *J. Appl. Bacteriol.* 44:321-323.
- Pearce, L.E. (1978). The effect of host-controlled modification on the replication rate of a lactic sstreptococcal bacteriophage.N.Z.J. Dairy Sci. Technol. 13:166-171.
- Peynaud E. i S. Domerq (1961). Etudes sur les bacteries lactiques des vins. *Ann. Techno. Agric.*, 10 (1), 43-60.
- Peynaud E. i S. Domerq (1968). Etude de quatre cent souches de coques hétérolactiques isolées de vins. *Ann. Ins. Pasteur*, XIX, 159-170.
- Peynaud E., S. Lafon-Lafourcade i S. Domerq (1965). Besoins nutritiomels de soixante-quatre souches de bacteries lactiques isolées de vin. *Bull OIV*, 415, 945-958.
- Peynaud, E. (1967). Etudes récentes sur les bactéries lactiques du vin in 2^{eme} Symposium International d'Enologie. Bordeaux-Cognac..
- Peynaud, E., i S. Domerq. (1967) Recent studies on the lactic acid bacteria of wine. 2^{eme} Symp. Int. Enol. 1:271-56 .
- Pilone G.J.i R.E. Kunkee (1965). Sensory characterization of wines fermented with several malo-lactic strain of bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 405-408.

- Pilone G.J. i R.E. Kunkee (1976). Stimulatory effect of malo-lactic fermentation on the growth rate of *Leuconostoc oenos*. Appl. Environ. Microbiol. 32: 405-406.
- Potter, N. N. i F.E. Nelson. (1952). Effects of calcium on proliferation of lactic streptococcus bacteriophage. I. Studies on plaque formation with modified plating technique. J. Bacteriol. 64:105-111.
- Prahl C., A. Lonvaud-Funel, S. Korsgaard, E. Morrison i A. Joyeux (1988). Etude d'un nouveau procede de declanchement de la fermentation malolactique. Con. Vign. Vin. 3: 197-207.
- Radler F. (1972). Problematik des bakteriellen saureabbaus. Weinberg Keller 19: 357-70.
- Radler, F. (1972). Etude microbiologique des bactéries de la fermentation malolactique. Conn. Vigne Vin, 1, 73-91.
- Rankine, B.C. (1977). Developments in malolactic fermentation of Australian red table wines. Am. J. Enol. Vitic. 28:27-33 .
- Rankine, B.C. (1972). Influence of yeast strain and malolactic fermentation on composition and quality of table wines. Am. J. Enol. Vitic. 23:152-8.
- Reinbold G.W., M.S. Reddy, i E.G. Hammond (1982) J. Food Protection 45:119.
- Reiter B. (1949) Lysogenic strains of lactic Streptococci. Nature, London 164:667-668.
- Relano P., M. Mata, M. Bonneau i P. Ritzenthaler. (1987) Molecular characterization and comparison of 38 virulent and temperate bacteriophages of *Streptococcus lactis*. J. Gen. Microbiol. 133:3053.
- Renault P., C. Gaillardin i H. Heslot (1988). Role of malolactic fermentation in lactic acid bacteria. Biochimie 70: 375-379.
- Reyrolle, J., M.C. Chopin, F. Latellier i G. Novel (1982). Lysogenic strains of lactic acid Streptococci and lytic spectra of their temperate bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol. 43:349-356.
- Ribéreau-Gayon, J., E. Peynaud, P. Ribereau-Gayon i P. Sudraud. (1976). Sciences et Techniques du vin. Traite d'Oenologie, tome III, pp 226-255. Dunod ed. Paris.
- Ribéreau-Gayon, J., Sur la desacidification biologique des vins. P.V Sèances Soc. Sci. Phis. Nat. Bordeaux. pp23-5 (1936).
- Rossi, J., L. Costamagna, i F. Clementi (1977). La flora malolactica in alcuni vini dell Italia centrale. Estratto dagli della Facolta de Agria dell Universita di Perugia 32:187-95 .
- Sancho E.D. i P. Ballesteros (1989). Malolactic fermentation in the wines of the "Montilla-Moriles" area. In: Comptes rendus du 4^{eme} Symposium International d'Oenologie. Bordeaux. Dunod éd., Paris.
- Sanders M.E. i T.R. Klaenhammer (1984) Phage resistance in a phage-insensitive strain of *Streptococcus lactis*: temperature-dependent phage development and host-controlled phage replication. Appl. Environ. Microbiol. 47:979-985.

- Sanders M.E. i 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. *App. Environ. Microbiol.* 46:1125-1133.
- Sanders M.E. i T.R. Klaenhammer (1981) Evidence for plasmid linkage of restriction and modification in *Streptococcus cremoris* KH. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:944-950.
- Sanders, M.E. i T.R. Klaenhammer. (1980). Restriction and modification in group N streptococci: Effect of heat on development of modified lytic bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:500-506.
- Sandine, W.E. (1977). New techniques in handling lacti cultures to enhance their performance. *J. Dairy Sci.* 60: 822-828.
- Sandine, W.E. i J.W. Ayres (1981). Method and starter compositions for the growth of acid producing bacteria and bacterial compositions produced thereby. U.S. Patent 4,282,225.
- Sapis-Domerq S, A. Bertrand, A. Joyeux, V. Lucmaret i C. Sarre (1978) Etude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vins; expérimentation de 1977, comparaison avec les resultats de 1975 et de 1976. *Conn. Vigne Vin*, 12(4), 245-275.
- Schillinger U., W. Holzapfel i O. Kandler. (1989) Nucleic acid hybridization studies on *Leuconostoc* and heterofermentative lactobacilli and description of *Leuconostoc amelibiosum* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.* 12, 48-55.
- Schütz M. i F. Radler (1974) Das vorkommen von malatenzym und malolactat-enzym bei verschiedenen milchsäurebakterien. *Arch. Mikrobiol.* 96, 329-339.
- Sechaud L, Rousseau M., Fayard B., Callegari M.L., Quenee P. i Accolas J.P. (1992). Comparative study of bacteriophages of *Lactobacillus helveticus*: morphology and host range. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1011-1018.
- Seifert W. (1901). Über die säureabnahme im wein und den dabei stattfindenden gährungsprozess. *Z. Landwirtsch Versuchs. Deut. Oest.*, 4, 980-992.
- Shimizu-Kadota M., M. Kiwaki, H. Hirokawa i N. Tsuchida (1985) ISLI: a new transposable element in *Lactobacillus casei*. *Mol. Gen. Genet.* 200:193-198.
- Shimizu-Kadota M., T. Sakurai i N. Tsuchida (1983) Prophage origin of a virulent phage appearing on fermentations of *Lactobacillus casei* S-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:669-674.
- Shimizu-Kadota M. i N. Tsuchida (1984) Physical mapping of the virion and the prophage DNAs of a temperate *Lactobacillus* phage FSW. *J. Gen. Microbiol.* 130:423-430.
- Sijtsma L., A. Sterkenburg i J.T.M. Wouters (1988) Properties of the cell walls of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110 and SK112 and their relation to bacteriophage resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2808-2811.
- Sijtsma L., N. Jansen, W.C. Hazeleger, J.T.M. Wouters i K.J. Hellingwerf (1990) Cell surface characteristics of bacteriophage-resistant *Lactococcus lactis* subsp.

- cremoris* SK110 and its bacteriophage-sensitive variant SK112. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3230-3233.
- Silver, J. i T. Leighton. (1981) Control of malolactic fermentation in wine. 2. Isolation and Characterization of a new malolactic organism. *Am. J. Enol. Vitic.* 32:64-72
- Sing W.D. i T.R. Klaenhammer (1986) Conjugal transfer of bacteriophage resistance determinants on pTR2030 into *Streptococcus cremoris* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1264-1271.
- Somers T.C. i L.G. Wescombe, (1982). Red wine quality: the critical role of SO₂ during vinification and conservation. *Aust. Grapegrow. Winemaker*, 220, 68, 70, 72-74.
- Southern E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragment separated by del electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503.
- Sozzi T., J.M. Poulin, R. Maret i R. Pousaz. (1978). Isolation of bacteriophage of *Leuconostoc mesenteroides* from dairy products. *J. Appl. Bacteriol.* 44: 159-161.
- Sozzi T., K. Watanabe, K. Stetter, M., Smiley (1981). Bacteriophages of the genus *Lactobacillus*. *Intervirology* 16: 129-135.
- Sozzi T.; H. Bauer; R. Maret; E. Dentan (1980). Some characteristics of five phages capable of lysing a strain of *Streptococcus lactis*. *Milchwissenschaft* 35 (1) 17-20.
- Sozzi, T. (1972). Etude sur l'exigence en calcium des phages des ferments lactiques. *Milchwissenschaft* 27:503-507.
- Sozzi, T. , J-M. Poulin i R. Maret. (1978) Effect of incubation temperature on the development of lactic acid bacteria and their phages. *J. Dairy Res.* 45: 259-265.
- Sozzi, T. ; R. Maret and J.M. Poulin. (1976). Mise en evidence de bacteriophages dans le vin. *Experientia* 32, 568-569.
- Sozzi, T., F. Gnaegi , N. D'Amico i H. Hose. (1982). Difficultes de fermentation malolactique du vin dues a des bacteriophages de *Leuconostoc oenos*. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 14, 17-23.
- Spettoli P., M.P. Nuti i A. Zamora (1984). Properties of malolactic activity purified from *Leuconostoc oenos* ML34 by affinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:(4), 900-903.
- Stenson L.R. i T.R. Klaenhammer (1985) *Streptococcus cremoris* M12R transconjugants carrying the conjugal plasmid pTR2030 are insensitive to attack by lytic bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 851-858.
- Teuber M. i J. Lembke (1983) The bacteriophages of lactic acid bacteria with emphasis on genetic aspects of group N lactic acid streptococci. *Antoine van Leewenhoek* 49:283-295.
- Teuber M. i M. Loof (1987). Genetic characterization of lactic streptococcal bacteriophages; in Ferretti J.J. Curtiss (eds): *Streptococcal genetics*. Washington, American Society for Microbiology, pp 250-258.

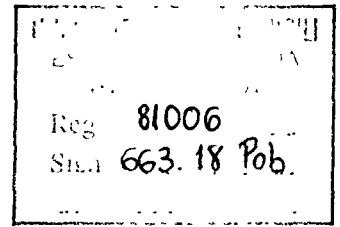
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDI DE LISOGÈNIA DE LEUCONOSTOC OENOS I INCIDÈNCIA DELS BACTERIÒFAGS SOBRE LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA DEL VI
Montserrat Poblet Icart
DL:T-1578-2009 / ISBN: 978-84-692-4539-2

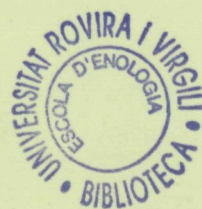
- Thomas T.D. i R.J. Lowrie (1975). *J. Milk Food Technol.*38: 275.
- Tomasz M., R. Lipman, D. Chowdary, J. Pawlak, G.L. Verdine i K. Nakanishi (1987). Isolation and structure of Covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science* 235:1204-235.
- Ueda K. i Komano T. (1984). Sequence-specific DNA damage induced by reduced mitomycin C and 7-N-(p-hidroxy-phenyl) mitomycin C. IRL Press Limited, Oxford 12: 6673-6683.
- Van Vuuren H.J.J. i L.M.T. Dicks (1993) *Leuconostoc oenos*: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 99-112.
- Watanabe K., K. Ishibashi, Y. Nakashima i T. Sakurai (1984) A phage resistant mutant of *Lactobacillus casei* wich permits phage adsorption but not genome injection. *J. Gen. Virol.* 65:981-986.
- Watanabe K., S. Takesue, K. Jin-nai i T. Yoshikawa. (1970). Bacteriophage active against the lactic acid beverage-producing bacterium *Lactobacillus casei*. *Appl. Microbiol.* 20:409.
- Watanabe K.; K. Ishibashi; K. Iki; Y. Nakashima; M. Hayashida (1987). Cell surface characteristics of some phage resistant strains of *Lactobacillus casei*. *J. Appl. Bacteriol.* 63:197-200.
- Watanabe, K. S. Takasue i K. Isibashi.(1980). DNA of phage PL-1 active against *Lactobacillus casei* ATCC 27092. *Agric. Biol. Chem.* 44: 452-455.
- Watanabe, K., T. Fikuzaki, M. Hayashida i Y. Nakashima.(1984). Electron microscopic study of the proces od DNA ejection from the head of PL-1, a *Lactobacillus casei* phage. *J. Gen. Microbiol.* 130:275-277.
- Webb R.B. (1962). Laboratory studies of the malo-lactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 13: 189-95.
- Weiller H.G. i F. Radler (1972) Vitamin- und Aminosäure Bedarf von Milchsäurebakterien aus Wein und von RebenBlättern. *Mitt. Hoheren Bundeslehr Versuchsanst. Wein Obst. Klosterneuburg*, 22, 4-18.
- Weiller H.G. i F. Radler (1972). Vitamin-und aminosäurebedarf von milchsäurebakterien. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitnk. Infektionskr. Hyg. Abt.* 2.124.: 707-32.
- Wibowo D., R. Eschenbruch, C.R. Davis, G.H. Fleet, T.H. Lee (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: areview. *Am. J. Enol. Vitic.*,36, 302-313.
- Wibowo, D., R. Eschenbruch, C.R. Davis, G.H. Fleet i T.H. Lee, (1985). Occurence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* , 36 (4), 302-313.
- Yamamoto K.R., B.M. Alberts, R. Bezinger, L. Lawhornel i G. Treiber (1970). Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylène glicol and its application to large-scale virus purification. *Virology* (40) 734-744.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDI DE LISOGÈNIA DE LEUCONOSTOC OENOS I INCIDÈNCIA DELS BACTERIÒFAGS SOBRE LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA DEL VI
Montserrat Poblet Icart
DL:T-1578-2009 / ISBN: 978-84-692-4539-2

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDI DE LISOGÈNIA DE LEUCONOSTOC OENOS I INCIDÈNCIA DELS BACTERIÒFAGS SOBRE LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA DEL VI
Montserrat Poblet Icart
DL:T-1578-2009 / ISBN: 978-84-692-4539-2

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDI DE LISOGÈNIA DE LEUCONOSTOC OENOS I INCIDÈNCIA DELS BACTERIÒFAGS SOBRE LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA DEL VI
Montserrat Poblet Icart
DL:T-1578-2009 / ISBN: 978-84-692-4539-2





UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESCOLA D'ENOLOGIA
BIBLIOTECA
Reg. 81006
Sign. 663.18 Pob

Autor PBLET ICART
Signatura 663.12 Pb
Títol Estudi de la lisogènia
Registre 81006

AQUEST LLIBRE ÉS DE CONSULTA

NO ES POT TREURE
DE LA SALA

