

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“Caracterización de bacteriófagos de
Lactobacillus parabuchneri y su posible
aplicación biotecnológica para la reducción
de la presencia de histamina en quesos”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

Iván Gómez Álvarez

Julio, 2016





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Miguel Ángel Álvarez González (IPLA-CSIC)

Dr. D. Víctor Manuel Ladero Losada (IPLA-CSIC)

CERTIFICA:

Que D. **Iván Gómez Álvarez** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 10ª promoción curso 2015-2016.

Oviedo, 8 de Julio de 2016

D. Miguel Ángel Álvarez González

D. Víctor Manuel Ladero Losada

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar este espacio para agradecer a mis tutores, Dr. Miguel A. Álvarez y Dr. Víctor Ladero, la oportunidad que me han brindado para realizar este trabajo en su grupo, así como su ayuda y guía; en especial a Víctor por el tiempo dedicado día a día en el laboratorio durante su desarrollo. Sus conocimientos, implicación, paciencia y apoyo han sido fundamentales para que este trabajo llegase a buen puerto.

Quisiera extender mis agradecimientos a todos los miembros del IPLA, que también han sido importantes, ayudándome cuando fue necesario, prestándome parte de su tiempo para explicarme metodologías y el uso de instrumentos, necesarios en algunos puntos del trabajo, por lo que han sido fundamentales para sacarlo adelante.

A Manuel Rendueles, coordinador del Máster, por su trabajo para que fuese posible y por su ayuda para solucionar cualquier problema que nos surgiese durante este año. Así como a todos los profesores, por las enseñanzas que nos han aportado durante el año.

A todos mis compañeros del máster, con quienes ha sido muy fácil ir a clase día a día, ya que siempre se puede contar con su ayuda.

A mis amigos, con los que he compartido tantas experiencias durante todos estos años.

Y, por supuesto, mis padres y familiares, por la educación que me han otorgado, su cariño y apoyo incondicional.

Sin ellos, esto nunca habría sido posible. Gracias a todos.

Índice

ÍNDICE

Resumen	II
Abstract	III
Índice de figuras y tablas	IV
1. Figuras	V
2. Tablas	VII
1. Introducción y objetivos	1
2. Consideraciones teóricas y experimentales	7
2.1. Bacterias del ácido láctico	8
2.2. Aminas biógenas	9
2.2.1. Definición y clasificación	9
2.2.2. Papel fisiológico	11
2.2.3. Efectos tóxicos	12
2.3. Histamina	14
2.3.1. Funciones Fisiológicas	14
2.3.2. Toxicología	15
2.3.3. Síntesis	16
2.3.4. Presencia en alimentos	17
2.3.5. Factores que influyen en la acumulación de histamina en quesos	19
2.3.6. Medidas para reducir la presencia de histamina	20
2.4. Bacteriófagos	21
2.4.1. Reseña histórica	21
2.4.2. Morfología y clasificación	22
2.4.3. Ciclo de multiplicación	24
2.4.4. Aplicaciones	25
2.4.5. Lisina fágica	26
3. Material y métodos	29
3.1. Muestras de queso analizadas	30
3.1.1. Extracción ABs	30

3.1.2. Derivatización con DEEM	30
3.1.3. Análisis cromatográfico	31
3.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	31
3.3. Búsqueda de bacteriófagos en las muestras de queso.....	33
3.3.1. Aislamiento de bacteriófagos	33
3.3.2. Test de la gota o spot.....	33
3.4. Inducción de profagos	34
3.5. Técnicas de ADN recombinante	34
3.5.1. Extracción de ADN.....	34
3.5.2. PCR	35
3.5.3. Visualización por electroforesis.....	36
3.5.4. Técnicas de clonación.....	36
3.6. Técnicas de producción de proteínas	38
3.6.1. Inducción de la Lisina del profago 1 de <i>L. parabuchneri</i>	38
3.7. Análisis de profagos	38
4. Resultados y discusión	40
4.1. Contenido de AB en muestras de queso	41
4.2. Búsqueda de bacteriófagos que infecten BAL	44
4.3. Análisis profagos	46
4.3.1. Análisis genómico de profagos de <i>L. parabuchneri</i>	46
4.3.2. Diseño de Tests por PCR	47
4.3.3. Análisis de la secuencia de profagos de <i>L. parabuchneri</i>	48
4.4. Inducción profagos	50
4.5. Clonación e inducción de una lisina fágica	54
5. Conclusiones	59
6. Índice de abreviaturas.....	61
7. Bibliografía.....	64
8. Anexos.....	73

Resumen/ Abstract

RESUMEN

Las aminas biógenas (ABs) son compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular con actividad biológica que se forman por la descarboxilación de aminoácidos (AAs) y están presentes de forma natural tanto en animales como en plantas, donde participan en una gran variedad de funciones fisiológicas. Sin embargo, debido a la acción microbiana, las ABs se pueden acumular en alimentos. La ingesta de alimentos con altas concentraciones de ABs puede provocar intoxicaciones, por ello existe un consenso generalizado para reducir la presencia de estos compuestos tóxicos en alimentos. Entre los alimentos en los que se encuentran concentraciones muy altas de ABs están los quesos, ya que constituyen una matriz ideal para la producción y acumulación de ABs. Las principales ABs en quesos son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y β - feniletilamina, siendo la histamina la que tiene mayor actividad biológica. Recientemente se ha identificado a *Lactobacillus parabuchneri* como el principal responsable de la acumulación de histamina en quesos. Esta especie pertenece al grupo de las bacterias del ácido láctico (BAL), que juegan un papel esencial en la elaboración de alimentos fermentados como el queso. Por lo que, para reducir la presencia de histamina en quesos hay que seguir estrategias que reduzcan la presencia de *L. parabuchneri* sin afectar a las BAL implicadas en la elaboración del queso. Una de las estrategias sugeridas recientemente es el uso de bacterió(fagos) que infecten específicamente a bacterias productoras de ABs. En este trabajo nos hemos planteado el aislamiento y caracterización de fagos de *L. parabuchneri*, como un primer paso para evaluar su potencial para reducir la presencia de *L. parabuchneri* en quesos y consecuentemente reducir la presencia de histamina en los mismos.

En este trabajo, se llevó a cabo la búsqueda de fagos capaces de infectar a *L. parabuchneri* a partir de diferentes muestras de quesos. Además, se realizó el análisis bioinformático de varios genomas de *L. parabuchneri* en busca de profagos, realizando una caracterización de los mismos. A partir de las secuencias encontradas, se identificó un gen que codifica una endolisina fágica con potencial antimicrobiano, realizándose la clonación y sobreexpresión del mismo. Este trabajo abre la puerta a la investigación del potencial de los fagos, así como alguno de sus enzimas, para ser utilizados como herramientas biotecnológicas para la eliminación de cepas productoras de histamina y, en consecuencia, la acumulación de histamina en alimentos.

ABSTRACT

Biogenic amines (BAs) are low molecular weight organic nitrogenous compounds with biological activity which are formed by decarboxylation of amino acids (AAs). They are naturally present in animals and plants where they participate in a great variety of physiological functions. However, due to microbiological action, BAs could be accumulated in food. The intake of food with high amounts of BAs can cause food intoxications, therefore there is a general consensus to reduce the presence of these toxic compounds in food. Cheeses are among the foods with the higher amounts of BAs, as they are an ideal matrix for the production and accumulation of BAs. Main BAs in cheeses are histamine, tyramine, putrescine, cadaverine and β -phenylethylamine, being histamine the one with the greater biologic activity. Recently, it has been identified *Lactobacillus parabuchneri* as the main responsible of the histamine accumulation in cheese. This species belongs to the group of lactic acid bacteria (LAB), which play an essential role in the elaboration of fermented foods like cheese. Thus, to reduce the presence of histamine in cheese, it's necessary to develop strategies that would reduce the presence of *L. parabuchneri* without affecting other LAB involved in cheese-making. One of recently suggested strategies is the use of bacterio(phages) that infect specifically BAs producing bacteria. In this work, we propose the isolation and characterization of *L. parabuchneri* phages, as first step to assess their potential to reduce the presence of *L. parabuchneri* in cheeses and consequently reduce the presence of histamine in them.

In this work, we carried out the screening for *L. parabuchneri* infecting phages from different cheese samples. Besides, bioinformatic analysis of several genomes of *L. parabuchneri* looking for prophages was performed. A genomic characterization of these prophages was done. From the sequences found, a gene encoding a phage endolysin was identified with antimicrobial potential, its cloning and overexpression was performed. This work constitutes a first step towards the evaluation of phage potential, as well as many of their enzymes, to be used as biotechnological tools for eliminating histamine-producing strains and, therefore, the accumulation of histamine in food.

Índice de Figuras y Tablas

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

1. Figuras

- Figura 1:** Reacciones de descarboxilación que dan lugar a la formación de las diferentes ABs a partir de los AAs correspondientes. [Adaptación de Ladero *et al.*, 2016]. 10
- Figura 2:** Clasificación de las ABs según su estructura química y según su número de grupos amino. [Adaptación de Ladero *et al.*, 2016]. 11
- Figura 3:** Esquema del destino en el intestino de las ABs ingeridas. [Adaptación de Ladero *et al.*, 2010]. 14
- Figura 4:** Estructura a pH 8 de la HDC dependiente de piruvato de *Lactobacillus saerimneri* 30a [Schelp *et al.*, 2001]. 17
- Figura 5:** Fago de *Lactococcus lactis*, familia *Siphoviridae*, especie P087. (Cedida por Jose L. Caso). 21
- Figura 6:** Clasificación en familias de los principales grupos de bacteriófagos, en función de su forma y del material genético que contengan [Ackerman, 2001]. 23
- Figura 7:** Representación esquemática de la morfología y de los ciclos de desarrollo de un bacteriófago (Ciclo lítico y ciclo lisogénico) durante la infección de la bacteria hospedadora [Adaptación de Martínez *et al.*, 2014]. 24
- Figura 8:** Mecanismo de acción del sistema holina/endolisina [Adaptación de Martínez *et al.*, 2014]. 27
- Figura 9:** Cromatograma obtenido a través de un análisis UPLC de la muestra de queso cabrales utilizada en la búsqueda de bacteriófagos. En él se indican los picos correspondientes a AAs y ABs. 42
- Figura 10:** Resultado del test de PCR para la presencia de profagos en las cepas de *Lactobacillus parabuchneri* realizada con los oligonucleótidos TestLysF y TestLysR. 47
- Figura 11:** Mapas genómicos de los profagos de *L. parabuchneri* analizados y tamaño. 48
- Figura 12:** Árbol filogenético de las secuencias genómicas de los diferentes profagos de *L. parabuchneri* analizados. 50

Figura 13: Genoma del profago antes y después de su recircularización tras la inducción y posición de los primers en cada caso.	51
Figura 14: Resultado de las PCR con TestLysF/R y con TestHol/Int tras la inducción de <i>L. parabuchneri</i> 10 con mitomicina C.	53
Figura 15: Árbol filogenético del alineamiento de las secuencias del gen de la lisina de los profagos P1LpbDSM15352, P1Lpb2E5-1, P1LpbDSM5707, P1Lpb10 y P2Lpb10.	55
Figura 16: PCR con los oligonucleótidos TestLysF/R de varias de las colonias obtenidas en la transformación con la ligación pACE y el gen <i>LysM</i> .	56
Figura 17: Electroforesis de la restricción del pACE con <i>NcoI</i> y <i>PstI</i> .	57
Figura 18: Resultado de la visualización en gel de proteínas de la inducción de la lisina fágica.	58

2. Tablas

Tabla 1: Diferentes alimentos en los que se puede encontrar histamina y algunas de las concentraciones más elevadas encontradas en esos alimentos [Ladero <i>et al.</i> , 2010].	18
Tabla 2: Cepas microbianas empleadas en el presente trabajo.	32
Tabla 3: Distintos compuestos ensayados para la inducción y concentraciones a las que se ensayaron en cada uno de los tres experimentos realizados.	34
Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para los diferentes ensayos y su secuencia de bases. Todos los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo fueron sintetizados por la empresa MacroGen (Korea).	36
Tabla 5: Concentración de las diferentes ABs encontradas en las muestras de queso utilizadas para el trabajo.	43
Tabla 6: Densidades ópticas de cultivos de <i>L. parabuchneri</i> DSM5707 iniciales y con diferentes concentraciones de ciprofloxacina tras 2 horas de inducción.	54
Tabla A.1: Codones de inicio, final, orientación y función de los genes del profago P1DSM15352 de <i>L. parabuchneri</i> DSM 15352.	74
Tabla A.2: Codones de inicio, final, orientación y función de los genes del profago P15707 de <i>L. parabuchneri</i> DSM 5707.	75
Tabla A.3: Codones de inicio, final, orientación y función de los genes del profago P12E51 de <i>L. parabuchneri</i> 2E5-1.	76
Tabla A.4: Codones de inicio, final, orientación y función de los genes del profago P1Lpb10 de <i>L. parabuchneri</i> 10.	77
Tabla A.5: Codones de inicio, final, orientación y función de los genes del profago P2Lpb10 de <i>L. parabuchneri</i> 10.	78

Introducción y

Objetivos

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La preocupación acerca de la calidad y la seguridad de los alimentos está a la orden del día, tanto por parte de las autoridades responsables de la seguridad alimentaria, como por parte de industrias y consumidores. Entre las sustancias potencialmente perjudiciales presentes en alimentos y que pueden generar toxicidad tras la ingesta de alimentos con altas concentraciones de las mismas, se encuentran las aminas biógenas (ABs). Las ABs son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular con actividad biológica que se forman debido a la descarboxilación de aminoácidos (AAs). Las ABs se encuentran presentes tanto en plantas como animales en los que participan en funciones fisiológicas esenciales para los seres vivos (Linares *et al.*, 2011). Sin embargo, en algunos casos, estos compuestos se pueden acumular en alimentos debido a la acción microbiana, provocando intoxicaciones derivadas de su ingesta (Ladero *et al.*, 2010). Entre los productos que suelen acumular mayores concentraciones de estas sustancias se encuentran productos pesqueros, carne, productos lácteos y vegetales fermentados y bebidas alcohólicas (Ladero *et al.*, 2010).

Las ABs se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios. Así, atendiendo a su estructura química se pueden clasificar como alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina y espermidina), aromáticas (tiramina, beta-feniletilamina) y heterocíclicas (histamina y triptamina). Basándonos en el número de grupos amino que posean se pueden dividir en monoaminas (tiramina, triptamina y beta-feniletilamina), diaminas (histamina, putrescina y cadaverina) y poliaminas (espermina y espermidina) (Linares *et al.*, 2011). Las ABs más importantes, tanto cuantitativa como cualitativamente, son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y beta-feniletilamina, productos de la descarboxilación de histidina, tirosina, arginina, lisina y beta-fenilalanina respectivamente (Linares *et al.*, 2011).

La histamina es una de las aminas biógenas que tiene una mayor actividad biológica y presenta una mayor toxicidad (Ladero *et al.*, 2010; del Río *et al.*, 2016), siendo además una de las ABs que se encuentra con mayor frecuencia y concentración en alimentos (EFSA, 2011). Además, es la única amina biógena para la que está legislado su contenido máximo en ciertos tipos de alimentos.

En la Unión Europea la concentración de histamina no puede superar los 200 mg/kg en pescado fresco, ni los 400 mg/Kg en productos pesqueros curados (European Commission, 2005), mientras que, en Estados Unidos, la *Food and Drug Administration* considera un límite general de 50 mg/Kg en pescados y sus derivados. Aunque no

existe legislación para su presencia en otros alimentos, concentraciones de histamina superiores a 500 mg/Kg se consideran peligrosas para la salud (FDA, 2001).

En organismos eucariotas la histamina interviene en diferentes procesos fisiológicos. Su función principal es participar en la respuesta inmunitaria inespecífica provocando una respuesta inflamatoria al ser liberada por los mastocitos, además de participar en los procesos de hipersensibilidad y alergia. Asimismo, puede actuar como neurotransmisor y participa en la regulación de procesos tan variados como secreción de ácidos en el estómago, en el crecimiento y diferenciación celular, en la regulación de los ritmos circadianos, de la temperatura corporal y de la ingesta de alimento, y en procesos de aprendizaje y memoria (Ladero *et al.*, 2010). En procariontes, sus funciones no se encuentran del todo claras, pero su biosíntesis parece relacionada con aumentar su resistencia a condiciones ambientales adversas, sobre todo a estrés ácido. Se ha comprobado que las reacciones de descarboxilación ayudan a controlar la homeostasis del pH citosólico cuando las células son expuestas a un medio externo ácido, aumentando su supervivencia (Pérez *et al.*, 2015). Si la síntesis de histamina por parte de estos microorganismos se produce en un alimento, se produce una acumulación de la misma, que en algunos casos puede llegar a concentraciones elevadas. El consumo de alimentos con altas concentraciones de histamina puede provocar intoxicaciones.

Debido a su gran actividad biológica, tanto su síntesis como degradación está muy controlada, de modo que puede ser metabolizada en el intestino por la acción del enzima diamino oxidasa (DAO). Además, la histamina también puede ser acetilada o metilada para reducir su actividad tóxica. Sin embargo, si se consume en gran cantidad o no se metaboliza correctamente, la histamina pasa a la corriente sanguínea y desencadena la liberación de adrenalina y noradrenalina, lo que da lugar a un aumento de la secreción gástrica, del ritmo cardíaco, taquicardia, migraña, elevación de azúcar en sangre y alta presión sanguínea (Linares *et al.*, 2011). Hay una gran variedad de microorganismos capaces de producir histamina, entre los que se encuentran levaduras, como algunas cepas de *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia jadinii* y *Geotrichum candidum*. Sin embargo, los principales responsables de la producción y acumulación de histamina en alimentos son bacterias, tanto gram negativas como gram positivas. Muchas de las bacterias gram negativas descritas como contaminantes de alimentos son capaces de producir histamina, entre ellas se encuentran *Hafnia alvei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* o *Serratia* spp. (Linares *et al.*, 2012). Sin embargo, su importancia en la producción de histamina se circunscribe a productos no fermentados, como pescados, que se han manejado

sin las adecuadas condiciones higiénico-sanitarias (Díaz *et al.*, 2016a). En productos fermentados su aporte a la presencia de histamina no es relevante, ya que se encuentran en bajas concentraciones y las condiciones ambientales no favorecen su crecimiento. Los principales responsables de la producción de histamina en productos fermentados son bacterias gram positivas, sobre todo cepas que pertenecen al grupo de las bacterias del ácido láctico (BAL). Se han descrito cepas productoras de histamina pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*. Dentro de este grupo, recientemente se ha descrito a *Lactobacillus parabuchneri* como la especie responsable de la producción y acumulación de histamina en quesos (Díaz *et al.*, 2016a). En esta especie se ha identificado el gen de la histidina descarboxilasa (*hdcA*), además de observarse su capacidad para generar biofilms en equipos de procesado de alimentos, constituyendo un reservorio de contaminación de alimentos muy difícil de eliminar (Díaz *et al.*, 2016b).

Para que se produzca la acumulación de histamina en alimentos es necesario que se cumplan una serie de requisitos, siendo el principal de ellos la presencia de microorganismos con capacidad de producir histamina. Además, existen otra serie de factores como la presencia del AA sustrato, la histidina, así como que existan las condiciones ambientales adecuadas para su producción (Linares *et al.*, 2011).

Hay que diferenciar dos tipos de alimentos en cuanto al tipo de medidas preventivas a adoptar para reducir la presencia de histamina. Por un lado, los pescados y alimentos no fermentados donde los principales microorganismos productores de histamina son bacterias gram negativas, que se desarrollan en este alimento debido a unas malas condiciones higiénicas en su manipulación o almacenamiento. En este caso, unas buenas prácticas higiénicas y el consumo de producto fresco solucionan el problema. Y, por otro lado, los alimentos fermentados, entre los que destacan los productos lácteos fermentados como el queso, que es el alimento fermentado en el que mayores concentraciones de histamina se han detectado (Maintz and Novak, 2007). En el caso del queso, las bacterias productoras son miembros de las BAL, del mismo grupo que aquellas que participan en el proceso de fermentación, por lo que las medidas higiénicas no resuelven el problema. Por otro lado, factores como el pH ácido, que favorece la síntesis de ABs por parte de las bacterias productoras, es esencial para que se lleve a cabo una adecuada fermentación láctea. Además, durante la maduración se produce la proteólisis de las caseínas lo que genera la presencia del AA sustrato. En consecuencia, es necesario buscar otras estrategias adecuadas para la reducción de la acumulación de ABs sin afectar a las BAL no productoras, ni a las propiedades organolépticas del alimento.

Existen diferentes medidas que se pueden adoptar para reducir la presencia de histamina en quesos. Como ya se ha comentado, la presencia de bacterias con capacidad aminogénica es una condición indispensable, por lo que, en primer lugar, se recomienda la utilización de cultivos iniciadores sin actividad histidina descarboxilasa. Para ello, es necesario el realizar una correcta caracterización de dichos cultivos que asegure no sólo la falta de capacidad de sintetizar ABs, sino también la ausencia de los genes implicados en la producción de ABs (Linares *et al.*, 2012). Sin embargo, no siempre se puede controlar la ausencia de microorganismos con actividad descarboxilasa ya que éstos pueden estar presentes en la materia prima formando parte de su microbiota, especialmente si la calidad de la misma es baja (Suzzi *et al.*, 2003).

La pasteurización es un método de eliminación por calor de microorganismos patógenos y alterantes que se ha mostrado eficaz en la reducción de la presencia de ABs en quesos (Fernández *et al.* 2007). No obstante, no es totalmente efectiva ya que se siguen detectando ABs en quesos elaborados con leche pasteurizada y, por otro lado, no es posible aplicar en todas las variedades de queso, ya que a veces están sometidas a nomas de elaboración, como es el caso de los quesos con denominación de origen que obliga al uso de leche cruda en su elaboración (Linares *et al.*, 2012). La incorporación de sal o especias se ha comprobado que puede reducir la acumulación de ABs en el producto final (Linares *et al.*, 2012; del Rio *et al.*, 2016). La sal reduce la actividad de agua, con lo que se eliminan patógenos y microorganismos alterantes (Linares *et al.*, 2012), además de reducir la producción de ABs (Del Rio *et al.*, 2016), mientras que especias como el ajo, la canela y el anís estrellado han sido capaces de actuar contra los microorganismos productores de ABs (Zhou *et al.*, 2016). Sin embargo, estos compuestos varían el sabor del producto final y, además, actualmente existe una demanda de productos bajos en sal por parte de los consumidores.

Al final del proceso de fabricación sigue siendo importante controlar las condiciones de conservación y los tratamientos para evitar la acumulación de una mayor cantidad de ABs hasta que el producto llegue al consumidor. De hecho, una importante causa de aumento en la acumulación de histamina en queso son los procesos posteriores a la maduración, como el corte, rebanado y rallado (Ladero *et al.*, 2009), debido a que durante los mismos se pueden producir contaminaciones con bacterias productoras de histamina. Además, es conveniente mantener una baja temperatura durante el almacenamiento para reducir el crecimiento microbiano.

Dado que como se ha explicado resulta difícil alterar las condiciones de elaboración y almacenamiento para reducir la presencia de ABs en general y de histamina en particular, sin afectar a la calidad final del producto, se han propuesto diversas estrategias alternativas, como la posibilidad de incluir en los cultivos iniciadores bacterias capaces de degradar ABs (Álvarez y Moreno-Arribas, 2014), Esta estrategia se ha probado con diferentes tipos de bacterias en diversos quesos, como el uso de *Brevibacterium linens* en la elaboración de queso Munster (Linares *et al.*, 2012) o *Lactobacillus casei* en un modelo de queso tipo cabrales (Herrero-Fresno *et al.*, 2012). En ambos casos se observó una reducción en el contenido de ABs.

Una alternativa para solucionar el problema, podría ser el uso de bacteriófagos (fagos) que infecten a cepas que produzcan histamina. Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias y necesitan la maquinaria biosintética de la célula hospedadora para poder fabricar sus componentes. Además, para la liberación de las nuevas partículas se produce la lisis de la pared celular y, por tanto, su muerte, por ello se ha pensado en su utilidad como agentes antibacterianos. Los bacteriófagos, y sus componentes como las lisinas, presentan una gran especificidad. Solo infectan a una especie, y en el caso de los fagos que infectan a BAL incluso a unas pocas cepas dentro de una especie. Esto los convierte en herramientas ideales cuando se quiere atacar a una población concreta, como la de cepas productoras de histamina, presente en un ecosistema complejo, como puede ser el queso.

Los objetivos de este trabajo son, por un lado, buscar bacteriófagos en queso, tanto líticos como atemperados, que infecten específicamente a bacterias productoras de histamina, más concretamente a diferentes cepas de *L. parabuchneri*, que es el principal responsable de la producción de histamina en quesos. Y por otro lado, caracterizar los fagos encontrados, así como analizar la presencia de genes con capacidad de sintetizar compuestos antibacterianos como las lisinas fágicas, ya que tanto los fagos como las lisinas de los mismos podrían constituir una herramienta biotecnológica para reducir la presencia de *L. parabuchneri* en estos productos y, consecuentemente, la presencia de histamina.

Consideraciones

Teóricas y

Experimentales

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

2.1. Bacterias del ácido láctico

El término de bacterias del ácido láctico (BAL) integra un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas con metabolismo fermentativo de carbohidratos cuyo producto final es el ácido láctico, además comparten otras características comunes, como ser microaerófilas, generalmente inmóviles, no forman esporas, o no reducen el nitrato (Dellaglio *et al.*, 1994). Se pueden dividir en dos grupos, homofermentativas y heterofermentativas, que se diferencian en que el único producto de la fermentación de las primeras es el ácido láctico, mientras que las segundas producen además CO₂, etanol y/o ácido acético (Kandler, 1983).

Dentro de este grupo se integran géneros filogenéticamente distantes: por un lado, están los géneros *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium*, pertenecientes a la subdivisión *Clostridium*, que presentan genomas con un contenido en Citosina + Guanina (C+G) inferior al 50% (Gasser *et al.*, 1994). Por otro lado, los géneros *Bifidobacterium* y *Propionibacterium*, de la subdivisión *Actinomycetes*, con un genoma con contenido C+G superior al 50% (Schleifer *et al.*, 1995).

En general, las BAL son bacterias que solo pueden crecer en ambientes con altos contenidos nutricionales en cuanto a fuentes de carbono y nitrógeno, por ello suelen vivir como saprofitas en suelos fértiles o en la parte aérea de las plantas. Además, algunas cepas, especialmente de *Lactobacillus*, son mutualistas y están presentes en el tracto digestivo y urogenital de animales, incluidos los humanos. Esto implica que muchas veces aparecen en alimentos vegetales y animales como contaminantes, circunstancia que ha sido aprovechada por el ser humano durante miles de años en la elaboración de alimentos fermentados. La acidez resultante del proceso fermentativo de los azúcares inhibe el desarrollo de patógenos y de microbiota alterante lo que permite alargar la vida útil de los alimentos fermentados. Las especies más utilizadas en las fermentaciones alimentarias pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* (McKay y Baldwin, 1990). Debido a que las BAL se han consumido durante miles de años y a que no se las ha asociado a procesos infecciosos se consideran bacterias seguras estando clasificadas en la categoría GRAS (*Generally recognized as safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) y con el estatus QPS (*Qualifiyed presumption of*

safety) por la EFSA (*European Food Security Authority*). Sin embargo, hay cepas de algunas especies pertenecientes al grupo de las BAL, pueden producir compuestos tóxicos como son las aminas biógenas (ABs).

2.2. Aminas biógenas

2.2.1. Definición y clasificación

Las ABs son bases nitrogenadas con actividad biológica, que se forman debido a la descarboxilación de aminoácidos. Están presentes en todos los seres vivos donde participan en una gran variedad de funciones fisiológicas. Sin embargo, en alimentos se pueden acumular debido a la actividad microbiana pudiendo causar intoxicaciones alimentarias.

Las ABs más importantes en alimentos, desde el punto de vista tanto cualitativo como cuantitativo, son la histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y β -feniletilamina, que son sintetizadas a partir de la descarboxilación de la histidina, tirosina, arginina, lisina, y β -fenilalanina, respectivamente (Figura 1). Además, a partir de la putrescina se pueden formar las ABs espermina y espermidina. Sin embargo, algunos autores no consideran a la espermina y espermidina como ABs ya que se sintetizan por reacciones de condensación y no de descarboxilación (Bardócz, 1999).

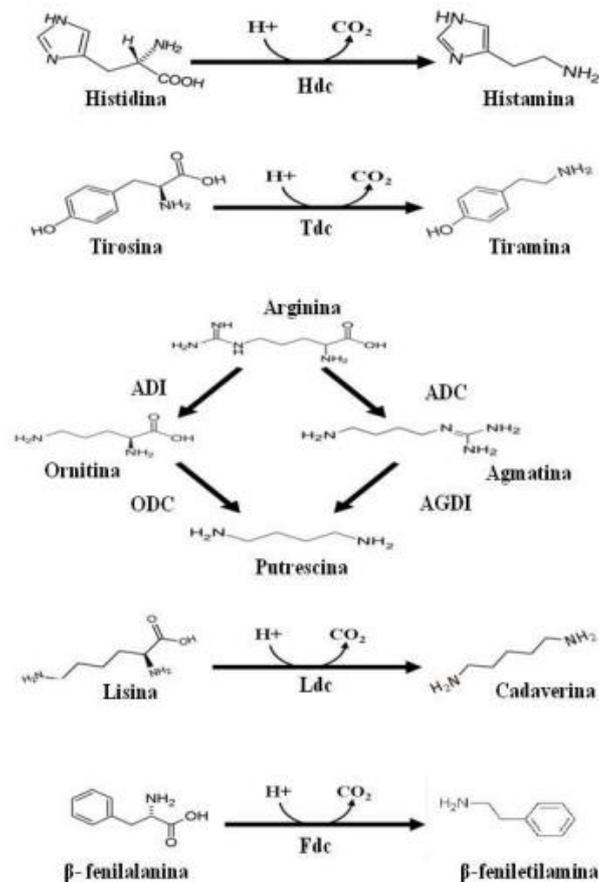


Figura 1: Reacciones de descarboxilación que dan lugar a la formación de las diferentes ABs a partir de los AAs correspondientes. Hdc: Histidina descarboxilasa, Tdc: Tirosina descarboxilasa, ADI: Ruta de la arginina deiminasa, ODC: Ornitina descarboxilasa, ADC: Arginina descarboxilasa, AGDI: Ruta de la agmatina deiminasa, Ldc: Lisina descarboxilasa, Fdc: β-fenilalanina descarboxilasa. [Adaptación de Ladero *et al.*, 2016].

Las ABs se pueden clasificar según diversos criterios (Figura 2). Así, atendiendo a su estructura química se pueden clasificar en aromáticas, donde se encuadran la tiramina y la β-feniletilamina, heterocíclicas, como la histamina y la triptamina; y alifáticas, donde se encuentran la putrescina y la cadaverina, además de espermina y espermidina. También se suelen clasificar atendiendo al número de grupos amino que poseen (Figura 2). Así, se dividen en monoaminas, con un único grupo amino, como la β-feniletilamina y la tiramina; diaminas, si poseen dos grupos amino, como la triptamina, histamina, putrescina y cadaverina; y poliaminas, si presentan más de dos grupos aminos, como la espermidina y espermina.

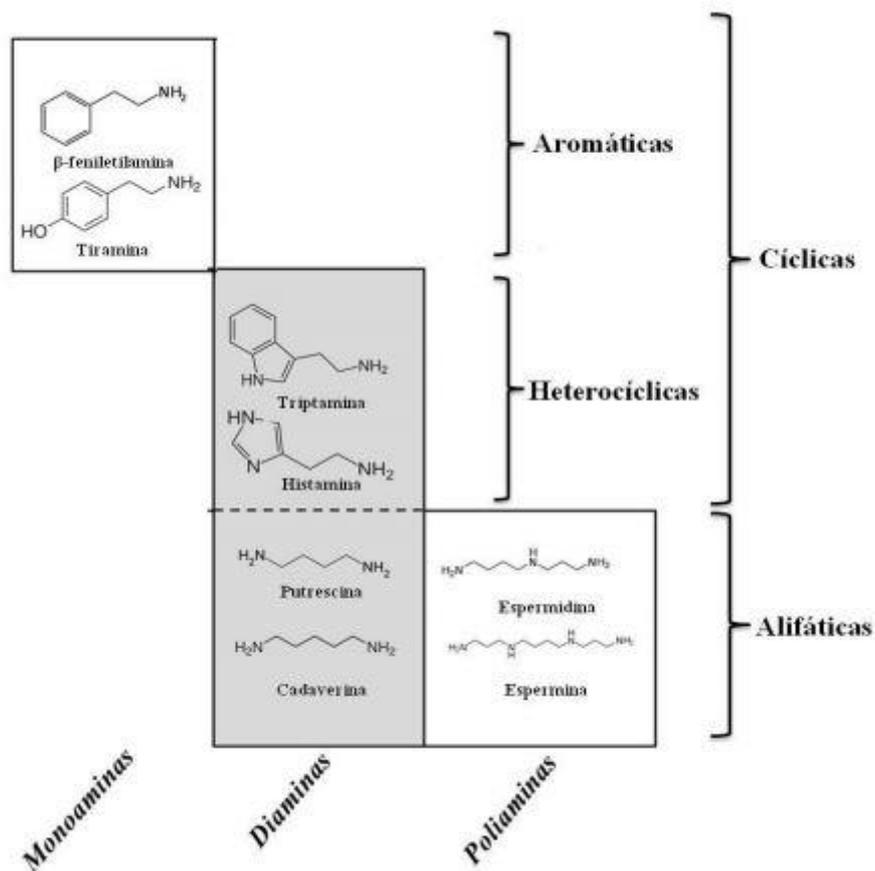


Figura 2: Clasificación de las ABs según su estructura química y según su número de grupos amino. [Adaptación de Ladero *et al.*, 2016].

2.2.2. Papel fisiológico

Las ABs están presentes tanto en animales como en plantas y microorganismos donde desempeñan funciones fisiológicas fundamentales en estos organismos además de actuar como precursores de diversas moléculas como hormonas, alcaloides, ácidos nucleicos y proteínas.

Entre sus funciones está el actuar como neuromoduladores, siendo sintetizadas en las neuronas a partir de AAs y almacenadas en vesículas hasta su liberación, por la despolarización de la membrana, al espacio extracelular donde se unen a receptores específicos y modulan la señal a través de segundos mensajeros (Silla Santos, 1996). Por ejemplo, la tiramina tiene un papel en la respuesta del sistema nervioso simpático, favoreciendo la vasoconstricción, la liberación de noradrenalina, con el consiguiente aumento del ritmo cardíaco, la respiración y el nivel de glucosa en sangre (Ladero *et al.*, 2010). La histamina juega un papel fundamental en la respuesta inmune local,

actuando como mediador en las reacciones de hipersensibilidad. Las poliaminas ayudan a mantener una alta actividad metabólica para el normal funcionamiento del intestino (Silla Santos, 1996). Además, putrescina, espermina y espermidina son necesarias para funciones críticas como modular la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Tabor *et al.*, 1985; Igarashi *et al.*, 2001).

En células procariotas su papel biológico no está del todo claro, aunque se les atribuyen dos funciones, principalmente relacionadas con las reacciones de descarboxilación. En primer lugar, estaría actuar como un mecanismo de defensa ante condiciones ambientales adversas, como la protección frente a pH ácidos ya que la reacción de descarboxilación consume un protón y libera una AB y CO₂, lo que ayudaría a neutralizar el pH en torno a la célula (Pérez *et al.*, 2015). También se las ha relacionado con procesos de respuesta ante el estrés osmótico y oxidativo. Por otro lado, también se han propuesto una función relacionada con la producción de energía, ya que el intercambio antiporte de AA/AB + generaría un gradiente eléctrico o fuerza de protón-motriz. Esta función podría ser especialmente importante en BAL para conseguir altos rendimientos energéticos aun careciendo de cadena respiratoria (Linares *et al.*, 2011).

2.2.3. Efectos tóxicos

Pese a tener un papel fundamental en diversas funciones necesarias para el normal funcionamiento del organismo, el consumo de cantidades elevadas de ABs tiene efectos adversos. Debido a su papel en diferentes procesos fisiológicos y a su gran actividad biológica los niveles de ABs están muy controlados, siendo el resultado de un equilibrio entre su síntesis endógena y su degradación en el organismo.

La principal vía de detoxificación de las aminas biógenas que entran en el organismo a través de la ingesta es la oxidación, a nivel de intestino, por acción de las amino oxidasas (AOs). Existen dos actividades principales la monoamino oxidasa (MAO), que degrada las monoaminas, y la diamino oxidasa (DAO) que degrada diaminas. Además, en el caso de la histamina existen enzimas capaces de acetilarla y metilarla como un sistema de detoxificación secundario. Estos sistemas son suficientes para eliminar las ABs ingeridas con los alimentos en una dieta normal. Sin embargo, si se ingieren alimentos con altas concentraciones de ABs, o el sistema de detoxificación se ve afectado, bien por factores genéticos o por el consumo de compuestos inhibidores de AO (IMAO e IDAO) (Ladero *et al.*, 2010), las ABs no son degradadas y pueden alcanzar el torrente sanguíneo, pudiendo producir alteraciones cardíacas, digestivas o

respiratorias. Las intoxicaciones alimentarias causadas por la ingesta de ABs más frecuentes se deben a la ingesta de histamina y tiramina. Las intoxicaciones por histamina más comunes están asociadas al consumo de pescado generalmente de la familia *Scombridae* por lo que se conoce como 'enfermedad escombroide'. En el caso de la tiramina, las intoxicaciones suelen asociarse al consumo de queso por lo que también se conocen como 'el síndrome del queso' (Linares *et al.*, 2016).

La ingesta de alimentos con elevadas concentraciones de ABs puede provocar diferentes alteraciones dependiendo del tipo y la cantidad de AB ingerida. Así el consumo de elevadas concentraciones de tiramina puede causar dolores de cabeza con migrañas, náuseas y vómitos, además de problemas respiratorios e hipertensión. La ingesta de putrescina puede causar taquicardias, hipotensión e, incluso, efectos carcinogénicos (Ladero *et al.*, 2010). El consumo de concentraciones elevadas de triptamina y β -feniletilamina también pueden causar problemas circulatorios, aumentando la presión sanguínea, lo que puede conducir a daños en el corazón o sistema nervioso central (Shalaby, 1997). Dado que la histamina es la AB con mayor actividad biológica, está entre las que provocan mayor toxicidad (Ladero *et al.*, 2010; del Río *et al.*, 2016). La ingesta de histamina provoca una gran variedad de efectos tóxicos cuando se ingiere a altas concentraciones. Así, puede provocar síntomas que se confunden con reacciones alérgicas e intolerancias alimentarias, como urticaria, granos hinchazón enrojecimiento de la piel. Además, puede provocar la dilatación de los vasos sanguíneos, lo que a su vez puede provocar hipotensión, sofocos y dolor de cabeza. Por otro lado, puede producir la contracción del músculo liso del intestino, dando lugar a calambres intestinales, con diarrea y vómitos (Silla Santos, 1996). A pesar de la gran variedad y gravedad de los síntomas asociados al consumo de ABs en la actualidad solo se ha regulado la presencia de histamina en pescados. Aunque existe un consenso en reducir la presencia de ABs en alimentos (EFSA, 2011).

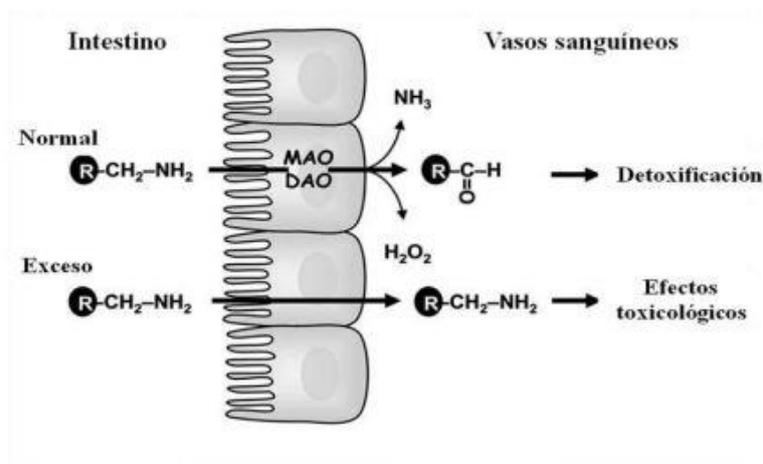


Figura 3: Esquema del destino en el intestino de las ABs ingeridas. MAO: Monoamina oxidasa, DAO: Diamina oxidasa. [Adaptación de Ladero *et al.*, 2010].

En la actualidad, solamente existe legislación que regula la presencia de histamina en pescados y productos derivados. La EFSA limita la concentración de histamina a 200 mg/Kg en pescado fresco y a 400 mg/Kg en productos pesqueros fermentados. La FDA (*United States Food and Drug Administration*), por su parte, determina un límite general de 50 mg/Kg en pescados y sus derivados. Y considera como nivel máximo, y peligroso para la salud, la presencia de 500 mg/Kg de histamina.

2.3. Histamina

La histamina es una amina biológica que participa en una gran variedad de funciones fisiológicas, debido a esta gran actividad biológica un aumento de su concentración en el cuerpo puede provocar diversas reacciones y disfunciones con una gran variedad de síntomas. La principal vía de entrada de histamina exógena es la dieta.

2.3.1. Funciones Fisiológicas

La histamina puede actuar como hormona local o neurotransmisor y se ha identificado su presencia en mastocitos, células sanguíneas y neuronas. La histamina interacciona con receptores específicos modulando diferentes funciones de las células diana. Estos receptores son cuatro, H1, H2, H3 y H4, y al interaccionar con ellos puede alterar la secreción gástrica, el crecimiento y diferenciación celular, el ritmo circadiano, la atención y la cognición. Además, esta molécula participa activamente en las

reacciones alérgicas interaccionando con receptores específicos dando lugar a la contracción del músculo liso, la dilatación de los vasos sanguíneos y el flujo de plasma sanguíneo a los tejidos periféricos (EFSA, 2011).

Los receptores H1 se encuentran en el músculo liso, células endoteliales y cerebro. En estos tejidos median en la contracción del tejido muscular liso y de las células endoteliales además de aumentar la permeabilidad vascular y la liberación hormonal para el control de los ritmos circadianos, la atención y la cognición. Los receptores H2 están presentes en las células parietales gástricas, músculo liso, sistema nervioso central y algunas células sanguíneas. Responden a la interacción con la histamina produciendo un aumento de la secreción ácida estomacal, la relajación del músculo liso o la inhibición de la función linfocitaria. Los receptores H3 aparecen asociados a neuronas no histaminérgicas, tanto en el sistema nervioso central como periférico, así como a células enterocromafines del intestino. Su función está relacionada con el proceso inflamatorio, produciendo la contracción del músculo liso y la dilatación de los vasos sanguíneos (Hill *et al.*, 1997). Más reciente es el descubrimiento de los receptores H4, los cuales tienen una alta homología en la secuencia de aminoácidos con los H3, sin embargo, su patrón de expresión es diferente (Hofstra *et al.*, 2003). Estos receptores aparecen en eosinófilos, donde podrían mediar en la respuesta autoinmune (Ling *et al.*, 2004).

2.3.2. Toxicología

Las intoxicaciones por histamina más habituales se deben a la ingesta de pescado, ya que es en este tipo de alimentos donde se han detectado las mayores concentraciones de este compuesto, Por ejemplo, en anchoas secas se han llegado a encontrar concentraciones de 2860 mg/Kg (EFSA, 2011).

En estos alimentos las causas de la presencia de histamina son siempre las malas condiciones de manejo y conservación, ya que está producida por bacterias gram negativas contaminantes. Tras los pescados, los quesos son el segundo alimento con las mayores concentraciones de histamina, superando en algunas ocasiones los 1000 mg/Kg (EFSA, 2011). En este caso, las bacterias responsables de su acumulación son algunas cepas de BAL, por lo que mejorar las condiciones de conservación no es suficiente para prevenir su acumulación (Díaz *et al.*, 2016^a).

La intoxicación por histamina se caracteriza por tener un periodo de incubación que va desde unos minutos hasta algunas horas, con síntomas posteriores que no duran más que unas horas. Tras el consumo de cantidades entre 25 y 50 mg, no se han

apreciado síntomas en voluntarios sanos, sin embargo, con el consumo de cantidades superiores a 75 mg aparecen los primeros síntomas, como dolor de cabeza o enrojecimiento. Por inyección directa en el intestino, voluntarios sanos han tolerado cantidades de hasta 120 mg de histamina, apareciendo a partir de esa cantidad urticaria, dolor de cabeza, ritmo cardíaco acelerado, descenso de la tensión arterial, náuseas y diarrea (EFSA, 2011). Recientemente se ha podido comprobar que concentraciones de histamina por encima de 400 mg/Kg tienen un efecto citotóxico en células intestinales (Linares *et al.*, 2016). Concentraciones superiores a los 500 mg/Kg se consideran gravemente perjudiciales para la salud.

2.3.3. Síntesis

La histamina es producida en alimentos por la descarboxilación enzimática del AA histidina. El enzima responsable es la histidina descarboxilasa (HDC), la cual puede ser de dos tipos: el primero lo forman aquellas HDC que dependen del piridoxal-5'-fosfato como cofactor y se encuentra en bacterias gram negativas y en células de los organismos eucariotas que producen este compuesto. El segundo grupo lo forman las que dependen de un residuo piruvilo unido covalentemente como grupo prostético, este tipo de enzima se encuentra en bacterias gram positivas, entre las que están las BAL (Martín *et al.*, 2005).

La ruta de formación de la histamina incluye la internalización de la histidina en la célula, la descarboxilación en el interior y la excreción de la histamina una vez sintetizada. Para ello, intervienen dos enzimas, un transportador de membrana denominado HdcP que se ocupa de la internalización y la excreción y el enzima HDC que elimina el grupo carboxilo del AA. Como resultado de esta reacción, se obtiene un gradiente de protones generado en el intercambio de una histidina monovalente por una histamina divalente, lo que genera una diferencia de carga transmembrana. Por otro lado, en la descarboxilación, se consume un protón y alcaliniza el citoplasma, generando un gradiente de pH. Las bacterias aprovechan estos gradientes para la generación de energía y como mecanismo de resistencia a condiciones ambientales adversas (Trip *et al.*, 2011).

La presencia del enzima HDC es poco común, y generalmente se encuentra asociado a cepa y no a especie. El gen que lo codifica (*hdcA*) se ha identificado en cepas de bacterias gram negativas, generalmente aisladas de pescado como *Photobacterium* spp., *Morganella morganii*, *Klebsiella* spp., y *Enterobacter* spp. (Takahashi *et al.*, 2003). Así como en gram positivas como *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus*

capitis, el actinomicete *Micrococcus* spp. y diferentes especies de BAL como *Lactobacillus saerimneri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus helveticus*, *Oenococcus oeni*, *Streptococcus thermophilus* *Tetragenococcus muriaticus* y *Tetragenococcus halophilus*.

Dentro del grupo de las BAL, la HDC mejor caracterizada es la de la cepa 30a de *L. saerimneri* (Schelp *et al.*, 2001). Este enzima está compuesto por un hexámero que consta de 6 cadenas α y 6 cadenas β (Figura 4). La forma activa deriva de un proenzima compuesto por 6 subunidades π . Estas cadenas π son cortadas entre 2 residuos serina por la acción de la proteína HdcB, dando lugar a las cadenas α y β activas (Martín *et al.*, 2005; Trip *et al.*, 2011).

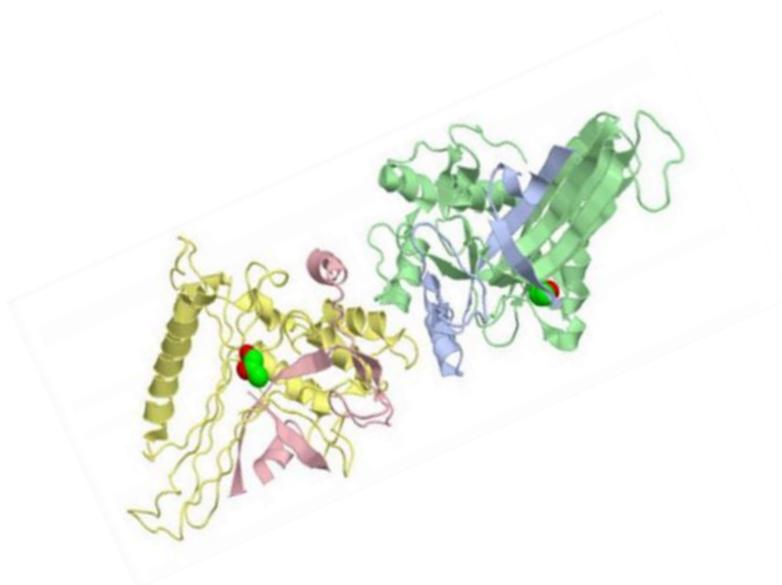


Figura 4: Estructura a pH 8 de la HDC dependiente de piruvato de *Lactobacillus saerimneri* 30a (Schelp *et al.*, 2001).

2.3.4. Presencia en alimentos

La histamina, como el resto de las ABs, se encuentra de manera natural en los alimentos, ya que está presente tanto en plantas como en animales, aunque suele estar en muy bajas concentraciones. Sin embargo, por la acción de determinados microorganismos se puede acumular en altas concentraciones en alimentos. De este modo, están presentes en un amplio rango de productos en diferentes concentraciones (Tabla 1).

Alimento	Contenido en histamina (mg/Kg)
Espinacas	2,0
Tomate concentrado	4,6
Kétchup	6,5
Soja fermentada	462
Pescado fresco	23,4
Atún enlatado	2000
Caballa ahumada	1780
Vino	25
Sidra	6,93
Cerveza	3
Salchichas	57
Jamón curado	114
Panceta curada	114
Chorizo	17,5
Fuet	15,2
Queso feta	846
Queso terrincho	217,8
Queso de leche cruda de cabra	86,4
Queso de leche pasteurizada de cabra	14,6
Queso azul de leche cruda	1041
Queso azul de leche pasteurizada	127
Queso de leche cruda sin madurar	110,8
Queso fresco de leche pasteurizada	60,2
Queso de leche cruda madurado	510,2
Queso de leche pasteurizada madurado	65,4

Tabla 1: Diferentes alimentos en los que se puede encontrar histamina y algunas de las concentraciones más elevadas encontradas en esos alimentos (Ladero *et al.*, 2010).

Como se comentó anteriormente, la acumulación de histamina en alimentos se debe a la presencia de bacterias con actividad descarboxilasa. En este contexto hay que diferenciar dos casos, por un lado, los alimentos no fermentados principalmente pescados, en los que la síntesis de ABs se debe a la presencia de microorganismos contaminantes, principalmente en bacterias gram negativas que denotan baja calidad higiénica del producto o deficiencias en su conservación. En estos alimentos un

adecuado manejo en el que se respeten las buenas prácticas higiénicas, así como una adecuada conservación en frío se consigue controlar el desarrollo de los microorganismos productores de histamina y por lo tanto su acumulación. Sin embargo, en alimentos fermentados los principales microorganismos responsables de la producción de histamina pertenecen al grupo de las BAL.

2.3.5. Factores que influyen en la acumulación de histamina en quesos

Para que se produzca la acumulación de histamina en un alimento, se tienen que dar tres condiciones: la presencia de bacterias con actividad histidina descarboxilasa, la disponibilidad del aminoácido histidina como sustrato y unas condiciones ambientales adecuadas para su producción (Linares *et al.*, 2012).

Microorganismos con actividad descarboxilasa positiva: Aunque en algunos casos se han descrito bacterias gram negativas productoras de histamina su presencia se puede evitar con el uso de materia prima de buena calidad y correctas condiciones de manejo y almacenamiento. Sin embargo, el mayor problema para la acumulación de histamina en quesos lo constituye la presencia de BAL productoras de histamina (BAL *hdc+*). Las BAL productoras de histamina pueden llegar al alimento bien porque se encuentren de forma natural en la materia prima, porque sean añadidas como cultivo iniciador, o como contaminantes durante el proceso de elaboración de los alimentos (Linares *et al.*, 2011; Diaz *et al.*, 2016c). Debido al papel fundamental que juegan las BAL en las fermentaciones alimentarias la aplicación de medidas para reducir la presencia de BAL *hdc+* puede afectar al proceso de fermentación. Se puede intentar reducir la presencia de estas bacterias, con medidas como la pasteurización de la leche, realizando una selección de los cultivos iniciadores (ausencia del gen *hdcA*), o adición de sal (Linares *et al.*, 2012), medidas que no siempre es posible su aplicación y que además no resultan totalmente efectivas.

Disponibilidad del AA sustrato: La presencia de histidina es un factor limitante en la acumulación de histamina. Sin embargo, durante la fabricación del queso, se produce la proteólisis de la caseína, con lo que la presencia de AAs libres es inevitable. De este modo, durante la maduración de los quesos la presencia de histidina no es un factor limitante para la producción de histamina. La concentración final de histamina en quesos depende del tiempo de maduración, de forma que quesos con una maduración larga pueden acumular concentraciones de ABs entre 10 y 200 veces mayores que quesos de maduración corta (Linares *et al.*, 2011).

Condiciones ambientales adecuadas: Existen diversos factores ambientales que favorecen la síntesis y acumulación de histamina en quesos. El factor más importante para la formación de ABs en estos alimentos es el pH ácido. La histidina descarboxilasa precisa de condiciones ácidas para que se produzcan cambios estructurales necesarios para su funcionamiento siendo además su óptimo de actividad en torno a pH 5. Además, se ha comprobado que los pH ácidos inducen la expresión de los genes del cluster HDC (Martín *et al.*, 2005; Calles-Enríquez *et al.*, 2010). También se ha visto que la temperatura y la concentración de sal afectan a la acumulación de histamina (Sumner *et al.*, 1990; Stratton *et al.*, 1991; Calles-Enríquez *et al.*, 2010).

2.3.6. Medidas para reducir la presencia de histamina

El principal problema a la hora de adoptar medidas para reducir la presencia de histamina en quesos radica en que las bacterias productoras pertenecen al grupo de las BAL y que aquellas condiciones que afectan a su producción (pH ácido, proteólisis, temperatura, sal, etc.) no se pueden variar sin que se afecte la textura, el sabor y la calidad final del producto final (Linares *et al.*, 2011). Se han propuesto diversas medidas para reducir el contenido en histamina, como la pasteurización, que es un método de eliminación por calor de microorganismos patógenos y alterantes que se ha mostrado eficaz en la reducción de la presencia de ABs en quesos (Fernández *et al.* 2007; Tabla 1). Sin embargo, esta medida no es totalmente efectiva, ya que sigue observándose la presencia de histamina en este tipo de quesos, además de que no se puede aplicar a ciertas variedades de queso sometidas a normas de elaboración, como podrían ser aquellos quesos con denominación de origen que obliga al uso de leche cruda (Linares *et al.*, 2012).

También se ha propuesto el uso de bacterias capaces de degradar ABs como cultivos adjuntos (Álvarez y Moreno-Arribas, 2014). Esta estrategia se ha probado con diferentes tipos de bacterias y en diversas variedades de quesos, como el uso de *Brevibacterium linens* en la elaboración de queso Münster (Linares *et al.*, 2012) o *Lactobacillus casei* en un modelo de queso tipo cabrales (Herrero-Fresno *et al.*, 2012) con buenos resultados, aunque sin llegar a eliminar completamente la presencia de histamina.

Idealmente, lo más efectivo sería eliminar de forma específica la presencia de bacterias productoras de histamina, de modo que no se alterasen los procesos de producción, ni las condiciones físico-químicas de los mismos. Una posibilidad para

eliminar de forma específica BAL *hdc+* sería el uso de bacteriófagos, capaces de infectar y eliminar específicamente a estas bacterias productoras de histamina.

2.4. Bacteriófagos

Los bacteriófagos, o simplemente fagos, son virus que infectan bacterias. Son agentes metabólicamente inactivos, por lo que necesitan utilizar la maquinaria biosintética bacteriana para poder fabricar sus componentes y multiplicarse. Lo hacen en el interior de la célula hospedadora, por lo que al finalizar la formación de las nuevas partículas fágicas (viriones), se lleva a cabo la lisis de las envolturas bacterianas para su liberación. Además, los fagos, y muy especialmente los fagos que infectan BAL, son muy específicos en cuanto a su hospedador, de forma que solo pueden infectar una sola especie bacteriana y en muchas ocasiones, incluso solo determinadas cepas de una especie. Por todo ello, desde su descubrimiento se ha pensado en ellos como agentes antibacterianos.

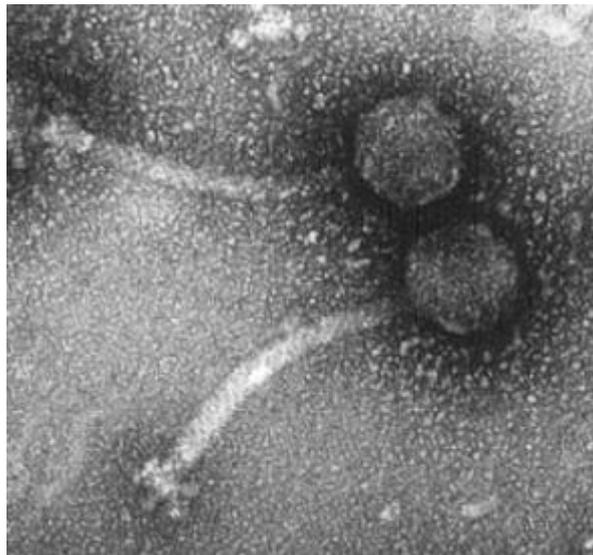


Figura 5: Fago de *Lactococcus lactis*, familia *Siphoviridae*, especie P087. (Fotografía cedida por Jose L. Caso, Area Microbiología de la Universidad de Oviedo)

2.4.1. Reseña histórica

Los bacteriófagos fueron descubiertos en 1915 por el inglés Frederick Twort, aunque fue Félix D'Herelle quién, un año después y de manera independiente, reconoció su naturaleza, estudió su efecto antibacteriano y los bautizó como bacteriófagos o comedores de bacterias (Harper y Kutter, 2008). Debido a su efecto antibacteriano

frente a bacterias capaces de causar infecciones en humanos, animales y plantas se plantearon como posibles agentes terapéuticos, surgiendo de este modo la terapia fágica.

Sin embargo, la aparición de los antibióticos hizo que su uso terapéutico quedase relegado a algunos países de Europa del este y, a partir de 1938, la investigación sobre fagos se centró en comprender los aspectos fundamentales de su ciclo de desarrollo y la estructura y composición de los viriones. Además, los estudios sobre el ADN y la comprensión del código genético impulsaron la investigación relacionada con la biología de los fagos (Summers, 2005). Sin embargo, en la actualidad con la aparición exponencial de resistencias a antibióticos en bacterias patógenas y el grave problema que esto supone para el sistema público de salud, el interés por la fagoterapia ha vuelto a resurgir.

2.4.2. Morfología y clasificación

Los viriones son mucho más pequeños que las bacterias a las que infectan, con lo que no es posible observarlos al microscopio óptico. Consisten en un fragmento de material genético rodeado de una envoltura proteica, denominada cápsida, que lo protege y sirve como vehículo de transmisión de una célula a otra. Al conjunto de material genético y cápsida se le denomina nucleocápsida, que está unida a una cola de naturaleza proteica. La nucleocápsida puede tener forma isométrica o alargada y las colas pueden ser contráctiles o no (Figura 6). En el extremo de la cola se encuentra la placa basal, las espinas y las fibras del tallo, que contienen las proteínas de reconocimiento y unión al hospedador (Ackermann, 2003). Se clasifican en diferentes familias según su forma y su material genético tal y como se muestra en la figura 6.

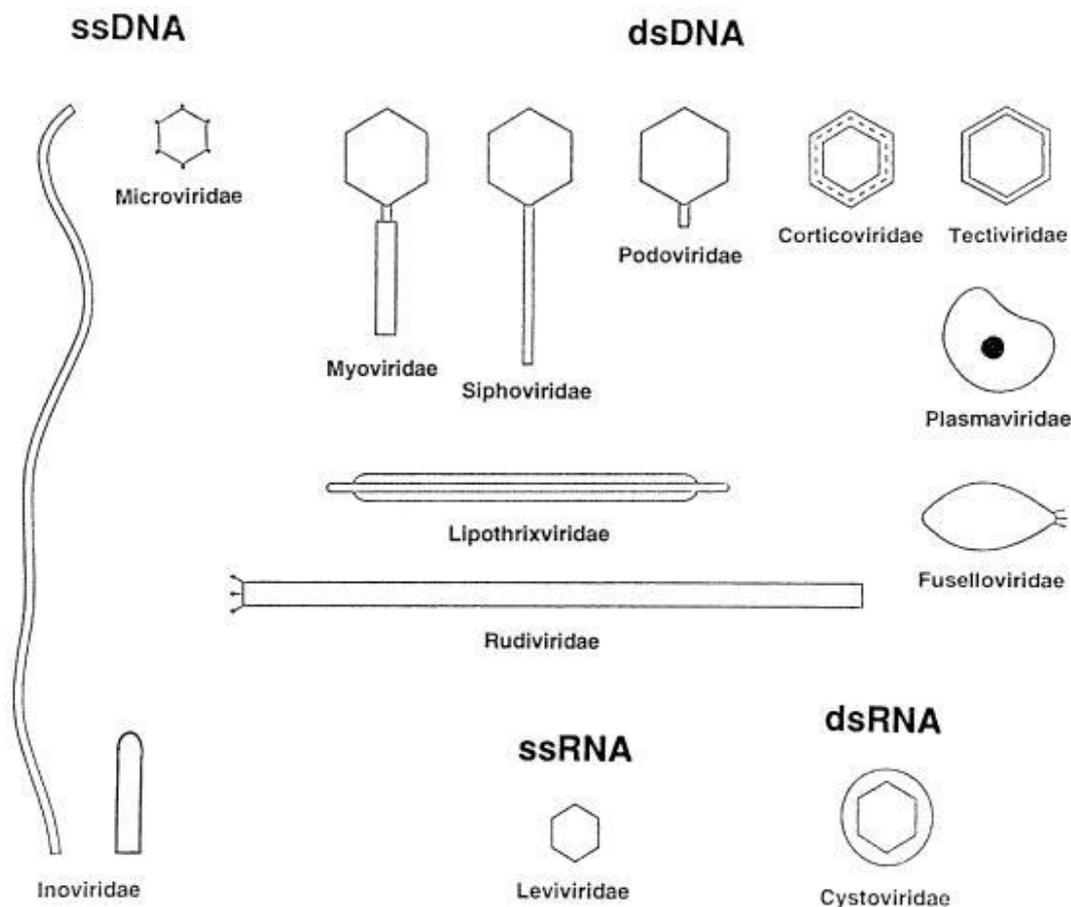


Figura 6: Clasificación en familias de los principales grupos de bacteriófagos, en función de su forma y del material genético que contengan (Ackerman, 2001).

Los tres morfotipos principales de los bacteriófagos son los que corresponden a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae* (Ackerman y Dubow, 1987; Figura 6). La mayoría de los fagos que infectan a BAL (también llamados lactofagos) pertenecen a la familia *Siphoviridae*, es decir, suelen estar compuestos por cabezas isométricas de menos de 60 nm de diámetro y colas no contráctiles menores de 200 nm (Jarvis *et al.*, 1991).

No obstante, existen excepciones dentro de los *Lactobacillus*, como el caso de algunos fagos de *L. helveticus* y *Enterococcus faecalis*, que presentan colas contráctiles perteneciendo por tanto a la familia *Myoviridae* (Séchaud *et al.*, 1992; Uchiyama *et al.*, 2008), al igual que el fago *fri* de *Lactobacillus plantarum* (Trevors *et al.*, 1983). Además, el fago Y1, también de *L. plantarum*, pertenecería a la familia *Podoviridae* (Yoon *et al.*, 2002) o el fago JCL1032 de *Lactobacillus delbrueckii*, que presenta una cola larga y una cabeza alargada grande (Forsman, 1993).

2.4.3. Ciclo de multiplicación

Los fagos, incluidos los lactófagos, se pueden dividir en dos grandes grupos dependiendo de su ciclo de vida (Figura 7):

Fagos virulentos o líticos: si siguen un ciclo lítico: El fago infecta la bacteria y se multiplica en su interior, provocando inmediatamente después la lisis del hospedador para liberar la progenie al exterior (Figura 7).

Fagos atemperados o lisogénicos: si pueden seguir un ciclo lisogénico: tras la entrada del fago en la célula, el ADN viral se puede integrar en el genoma celular, pasándose a denominar profago y replicándose junto a la célula hospedadora y transmitiéndose de una generación a otra sin que se produzca lisis celular. Las células de las generaciones posteriores se denominan células lisógenas. En determinadas condiciones, el profago puede comenzar un ciclo lítico, que conducirá a la expresión de sus proteínas para formar nuevos viriones y la lisis posterior para su liberación (Figura 7).

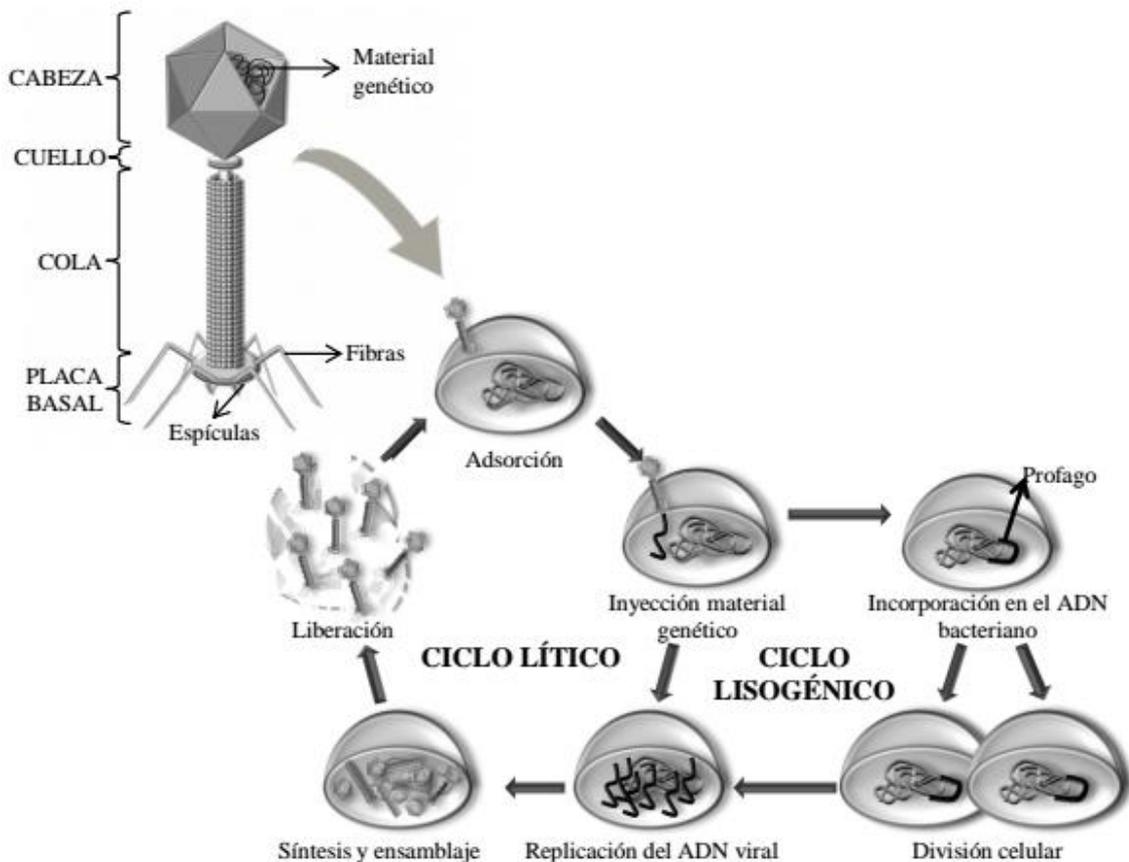


Figura 7: Representación esquemática de la morfología y de los ciclos de desarrollo de un bacteriófago (Ciclo lítico y ciclo lisogénico) durante la infección de la bacteria hospedadora [Adaptación de Martínez et al, 2014].

2.4.4. Aplicaciones

Los fagos tienen una capacidad bactericida que ha sido utilizada durante mucho tiempo en los países de Europa del este con fines terapéuticos frente a enfermedades provocadas por bacterias, tanto en animales como en humanos (Sulakvelidze y Morris, 2001). Recientemente, tras la aparición del problema de las resistencias a antibióticos en bacterias patógenas, se está recuperando el interés por su uso frente a infecciones bacterianas provocadas por bacterias multiresistentes. Los fagos y sus proteínas poseen una serie de características que los convierten en buenos agentes antibacterianos:

Alta especificidad por su hospedador: Habitualmente, los fagos infectan a una especie concreta y muchas veces son incluso específicos de cepa, lo cual permite la eliminación de la bacteria indeseada sin que afecte al resto de la microbiota del ambiente donde se apliquen.

Alta efectividad: Son efectivos incluso frente a bacterias resistentes a antibióticos, lo cual los convierte en una buena alternativa para hacer frente a este problema.

Inocuidad: El hecho de que solo infecten bacterias implica que no van a infectar a células eucariotas de plantas ni animales, por lo que su uso no es peligroso para el ser humano.

Auto-amplificación: Tras el ciclo de infección, se genera un gran número de partículas fágicas capaces de llevar a cabo una nueva infección, por lo que se pueden aplicar en dosis bajas reduciendo el coste de producción y aplicación.

Además de ser propuestos como agentes terapéuticos frente a infecciones bacterianas, también se han propuesto, tanto el uso directo de los fagos como algunas de sus proteínas, como herramientas útiles en seguridad alimentarias para detectar o impedir la contaminación bacteriana en distintos puntos de la cadena alimentaria (García *et al.*, 2008):

Terapia fágica para animales de granja: Al igual que en humanos, el uso inapropiado de antibióticos en animales ha dado lugar a la aparición de bacterias resistentes que, en el caso de aquellos destinados a la alimentación humana, pueden transmitirse vía alimentaria. Los fagos podrían constituir una alternativa en el tratamiento de enfermedades animales.

Descontaminación de alimentos frescos: Su uso permite la eliminación de bacterias que puedan contaminar la superficie de alimentos frescos como carne, frutas y vegetales.

Descontaminación de superficies: Un problema importante al que se enfrenta la industria alimentaria es la capacidad de formar biofilms por parte de las bacterias, a que confiere una gran resistencia a los microorganismos contaminantes, haciéndolos difíciles de eliminar (Giaouris *et al.*, 2014). Los fagos se han propuesto como un agente eficaz en la eliminación de biofilms (Gutierrez *et al.*, 2015).

Uso como bio-conservantes: El uso de bacteriófagos como conservantes ha sido efectivo para la eliminación de bacterias patógenas aumentando de este modo su vida útil (Modi *et al.*, 2001; Zuber *et al.*, 2008).

Detección de bacterias en alimentos: Debido a su alta especificidad, pueden detectar bacterias patógenas presentes en los alimentos (Schmelcher y Loessner, 2014). En estos casos se suelen acoplar la adición de fagos a las muestras a analizar con sistemas para detectar compuestos liberados por las células lisadas o la expresión de genes *reporter* que evidencien la multiplicación fágica.

Además de los bacteriófagos, algunos de sus componentes también han sido propuestos como posibles herramientas biotecnológicas para hacer frente a las infecciones bacterianas o para su biocontrol en alimentos. De los diferentes componentes fágicos con capacidad antibacteriana los más estudiados son las lisinas fágicas.

2.4.5. Lisina fágica

Durante el ciclo de desarrollo de un fago, éste debe atravesar la cubierta celular por lo menos en dos ocasiones, al principio de la infección, para introducir su material genético y al final del ciclo infectivo para permitir la liberación de la progenie. En el primer caso la degradación del peptidoglicano se produce de forma localizada en la zona de contacto del virión y la célula hospedadora. Al final del ciclo lítico se produce una lisis completa de la célula que afecta a toda su pared y es llevada a cabo por la acción de endolisinas.

Las peptidoglicano hidrolasas, como se apunta, tienen la función de degradar localmente el peptidoglicano de la pared celular para permitir la entrada del material genético del fago, generando un pequeño poro a través del cual penetra la cola del fago (Rodríguez-Rubio *et al.*, 2013).

Las endolisinas se acumulan en el citoplasma bacteriano a la vez que se produce el ensamblaje de los componentes de las nuevas partículas virales. El mecanismo de actuación más común que permite el acceso y la degradación del peptidoglicano es

conocido como sistema holina/endolisina (Figura 8). En él, la holina se inserta en la membrana bacteriana, generando poros por los que la endolisina accede al peptidoglicano, al que comienza a degradar (Wang *et al.*, 2000). Tras destruir la pared celular, la presión osmótica produce la rotura de la membrana y la liberación de la progenie fágica.

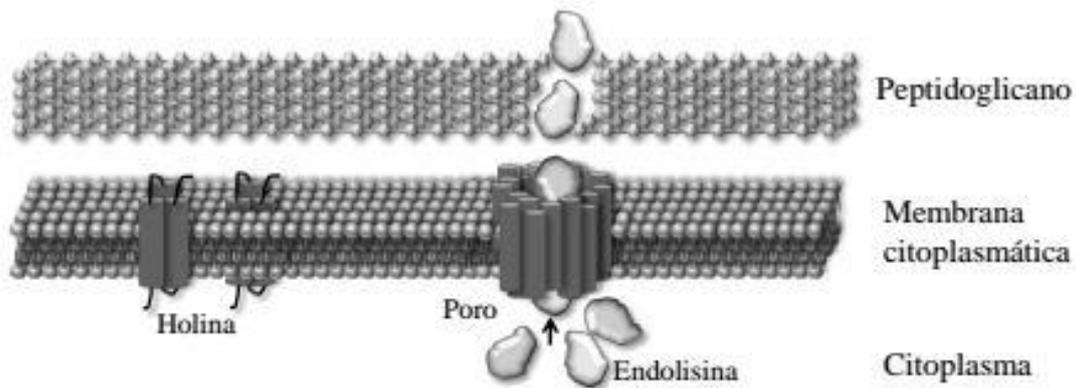


Figura 8: Mecanismo de acción del sistema holina/endolisina [Adaptación de Martínez *et al.*, 2014].

La estructura típica de una endolisina fágica incluye un dominio N-terminal catalítico, encargado de la actividad enzimática, y un dominio C-terminal de unión de alta afinidad a carbohidratos específicos de la pared celular bacteriana (Hu *et al.*, 2010). El dominio N-terminal puede tener diferentes actividades enzimáticas, dependiendo del tipo de enlace que rompan, y se pueden agrupar en 4 tipos (García *et al.*, 2012):

Glicosilasas: Hidrolizan el enlace β -1,4 ortoglicosídico. Se llaman N-acetil- β -D-glucosaminidasas si cortan el peptidoglicano entre la N-acetil-glicosamina (NAG) y el ácido N-acetil-murámico (NAM) y N-acetil- β -D-muramidases si lo hacen entre el NAM y la NAG.

Transglicosilasas líticas: Realizan una actividad similar a las muramidases anteriores, pero en este caso dejan un enlace 1,6 anhidro en el residuo del NAM.

Amidasas: Hidrolizan el enlace amida entre el NAM y el primer AA de la cadena peptídica.

Endopeptidasas: Hidrolizan el enlace entre dos AAs, bien del tetrapéptido o bien del puente interpeptídico.

Se ha demostrado que las endolisinas fágicas de especies pertenecientes al grupo de bacterias gram positivas son capaces de lisar dichas bacterias cuando se añaden de

forma exógena, por lo que se han propuesto como agentes antibacterianos de aplicación en terapia fágica tanto a nivel clínico como en seguridad alimentaria (Rodríguez-Rubio *et al.*, 2013). Además, al igual que los bacteriófagos de las que proceden son altamente específicas, actuando sólo sobre aquellas bacterias que pertenecen a la especie a la que el bacteriófago es capaz de infectar.

Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras de queso analizadas

Se seleccionaron 6 muestras de queso comerciales de distintos tipos con el objetivo de encontrar en ellos bacteriófagos capaces de infectar a cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina. Previamente, se analizó el contenido de ABs en cada una de ellas mediante la técnica de cromatografía líquida UPLC (Redruello *et al.*, 2013).

3.1.1. Extracción ABs

Para el análisis del contenido en ABs de las muestras de queso mediante UPLC, fue necesaria su extracción y derivatización previa. Para ello se tomó 1 g de cada muestra, que se resuspendió en 9 ml de HCl 0,1M - TDPA 0,2% y, a continuación, se disgregaron con ayuda de un *Ultra-Turrax* (OMNI International, Waterbury USA) durante 2 minutos a 20.000 rpm. Tras lograr una mezcla homogénea, se incubó 30 minutos en un baño de ultrasonidos y posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 minutos en una centrifuga Eppendorf 5810 de rotor basculante. Tras la centrifugación, la muestra se separó en 3 fases: El pellet con células y restos de partículas sólidas, la fase acuosa, que es donde se encuentran las ABs, y una parte superior de grasa. Se recogió 1 ml de la fase acuosa, con cuidado de no tomar parte de la grasa, y se filtró a través de una membrana no estéril de 0,45 µm (VWR). Este filtrado se desproteinizó utilizando filtros Amicon (3K - 5K) mediante una centrifugación a 7.000 rpm durante 1 hora con una centrifuga Eppendorf 5415R. Las muestras se conservaron a -20°C hasta el momento de la derivatización.

3.1.2. Derivatización con DEEM

Para poder detectar las ABs, las muestras fueron derivatizadas con dietiletoximetilen malonato (DEEM), que se une a los grupos amino presentes en las ABs. La reacción se llevó a cabo añadiendo a 100 µl de muestra, 175 µl de buffer borato 1M (ácido bórico 1M neutralizado con NaOH hasta alcanzar un pH de 9.0), 75 µl de metanol, 2 µl de ácido L-2 aminoadípico 2 g/L (estándar interno) y 3 µl de DEEM. La mezcla se incubó durante 45 minutos a 30°C en un baño de ultrasonidos para evitar que se formen agregados y, a continuación, se dejó 2 horas a 70°C para eliminar los restos de

DEEM no unido a grupos amino. Finalmente, se filtró cada muestra a través de una membrana de 0,22 µm (VWR) antes de su inyección en el cromatógrafo.

3.1.3. Análisis cromatográfico

El análisis se realizó con ayuda de un cromatógrafo H-Class Acquity UPLC™ system (Waters). La separación se realizó en una columna de fase reversa Waters Acquity UPLC™ BEH C18 1,7 µm (2,1 mm x 200 mm) siguiendo las condiciones establecidas en Redruello *et al.*, (2013). La detección de los compuestos derivatizados se realizó por absorbancia a 280 nm mediante un detector fotodiodo acoplado al cromatógrafo. Los datos fueron adquiridos y analizados mediante el software Empower version 2 (Waters).

3.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para la búsqueda de bacteriófagos se emplearon diferentes cepas de *L. parabuchneri* (Tabla 2), las cuales se crecieron en medio MRS (OXOID) y se incubaron a 37°C en anaerobiosis (10% H₂, 10% CO₂ y 80% N₂) utilizando una campana Mac 500 (Don Whitley Scientific, West Yorkshire, UK), tanto en medio líquido como en placa. En este último caso el medio MRS se suplementó con agar al 2% p/v. Cuando las cepas se utilizaron como posibles hospedadores, el medio MRS se suplementó con 10 mM Ca(NO₃) y 10 mM Mg₂SO₄ (MCM) para la estabilización de las partículas virales. Cuando estas cepas se utilizaron para la búsqueda de fagos a partir de muestras de queso se añadió Cicloheximida 20 µg/ml para inhibir el crecimiento de mohos y levaduras.

Para la siembra por el método de doble capa el medio MRS se suplementó con agar al 2% p/v, en la capa inferior y al 0,7% p/v en la capa superior.

Especie	Cepa	Origen	Referencia
<i>L. lactis</i>	NZ9000	Producto lácteo	Linares <i>et al.</i> , 2013
<i>L. parabuchneri</i>	DSM5707	Saliva humana	Cepa tipo, DSMZ
	DSM5987	Queso	DSMZ
	B301	Queso	Martín <i>et al.</i> , 2005
	2E5-1	Queso Emmental	Díaz <i>et al.</i> , 2016b
	2E6-1	Queso Emmental	Díaz <i>et al.</i> , 2016b
	2E8	Queso Emmental	Díaz <i>et al.</i> , 2016b
	2E9-1	Queso Emmental	Díaz <i>et al.</i> , 2016b
	2E11-1	Queso Emmental	Díaz <i>et al.</i> , 2016b
	2E13	Queso Emmental	Díaz <i>et al.</i> , 2016b
	10	Queso cabrales	Díaz <i>et al.</i> , 2016b
	C10	Queso cabrales	Díaz <i>et al.</i> , 2016a
	C14	Queso cabrales	Díaz <i>et al.</i> , 2016a
	Z1-1	Queso Zamorano	Díaz <i>et al.</i> , 2016b
	MZ38	Queso Mozzarella	Díaz <i>et al.</i> , 2016a
	MZ78	Queso Mozzarella	Díaz <i>et al.</i> , 2016a
MZ84	Queso Mozzarella	Díaz <i>et al.</i> , 2016a	

Tabla 2: Cepas microbianas empleadas en el presente trabajo.

Para la inducción de profagos se utilizaron 2 cepas de *L. parabuchneri*: 10 y DSM5707 (Tabla 2), para las que se utilizó medio de cultivo MCM (OXOID) y se incubaron a 37°C en anaerobiosis. Para realizar la clonación de la lisina de los profagos, se utilizó el plásmido de expresión controlada por agmatina (pACE) (Linares *et al.*, 2015) en la cepa NZ9000 de *L. lactis* (Tabla 2). Los medios utilizados fueron M17 suplementado al 0,5%p/v de glucosa (GM17), GM17 con sacarosa 0,5M (SGM17) y SGM17 suplementado con un 3% de glicina (SGGM17). Los cultivos se incubaron en una estufa a 32°C.

3.3. Búsqueda de bacteriófagos en las muestras de queso

3.3.1. Aislamiento de bacteriófagos

La busca de bacteriófagos capaces de infectar a *L. parabuchneri* a partir de muestras de queso se realizó mediante el siguiente protocolo: Se pesaron 2 g de queso a los que se añadieron 20 ml de Tampón SM (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM Mg₂SO₄, 100 mM NaCl) en una bolsa adecuada para su homogeneización durante 5 minutos en un *Stomacher* Lab-Blender 400 (Seward Medical). Posteriormente, 9 ml de MCM se inocularon con 100 µl de un cultivo *over night* (*o/n*) de las diferentes cepas ensayadas a los que se añadieron 500 µl del homogenizado obtenido en el *Stomacher*, incubándose *o/n* en anaerobiosis a 37°C. Posteriormente, se realizaron dos rondas de cultivos de enriquecimiento. Para ello los tubos de cultivo inoculados el día anterior se centrifugaron durante 15 minutos a 3100 rpm en una centrífuga Eppendorf 5810 con rotor basculante. Del sobrenadante, donde estarían los fagos, se añadieron 500 µl a 9 ml de medio MCM fresco, junto a 100 µl de la cepa correspondiente, incubándose en las condiciones anteriormente descritas durante la noche.

3.3.2. Test de la gota o spot

Para comprobar la presencia de bacteriófagos en los sobrenadantes de los cultivos de enriquecimiento, se llevó a cabo la prueba de la gota o spot por el método de doble capa.

Para facilitar el trabajo debido al gran número de cultivos de enriquecimiento (6 muestras de queso y 16 cepas de *L. parabuchneri* diferentes por muestra), se realizaron mezclas de 4 sobrenadantes que se ensayaron sobre todas las cepas utilizadas en los cultivos de enriquecimiento (16 cepas). Para ello, se colocaron 300 µl de cada uno de los 4 sobrenadantes en un tubo eppendorf hasta alcanzar un volumen total de 1,2 ml, que fue filtrado a través de membranas estériles de 0,45 µm (VWR).

A continuación, gotas de 10 µl de cada mezcla de sobrenadantes se colocaron sobre placas de MRS con agar al 2%. En el centro de cada placa se colocó una gota (10 µl) de sobrenadante de un cultivo *o/n* de la cepa a ensayar como control negativo. Las gotas se dejaron secar bajo la llama de un mechero Bunsen. Una vez secas, se añadieron sobre ellas 3 ml de medio MCM semisólido (agar al 0,7%) en el que previamente se habían inoculado 300 µl de la cepa a ensayar en cada una de las placas. La existencia de bacteriófagos en sobrenadantes se evidenciaría por calvas de crecimiento bacteriano o placas de lisis en el lugar donde se colocó la gota.

3.4. Inducción de profagos

La inducción de profagos se realizó añadiendo un compuesto inductor del ciclo lítico, mitomicina C o ciprofloxacina, a cultivos en fase exponencial temprana. Para ello se inocularon 10 ml de medio con 100 μ l de un cultivo *o/n* de las cepas de *L. parabuchneri* 10 y DSM5707. Cuando estos cultivos alcanzaron una densidad óptica de entre 0,3 y 0,7, se añadió el compuesto inductor a una concentración determinada (Tabla 3) y se siguió la evolución de la DO del cultivo, en un espectrofotómetro eppendorf, comparándola con un tubo control (cepa sin adición del compuesto inductor).

Compuesto	Concentraciones ensayadas		
Mitomicina C	1 μ g/ml 5 μ g/ml	1 μ g/ml 5 μ g/ml 10 μ g/ml	10 μ g/ml
Ciprofloxacina	1 μ g/ml 4 μ g/ml 8 μ g/ml	5 μ g/ml 20 μ g/ml	2 μ g/ml 20 μ g/ml 50 μ g/ml 200 μ g/ml

Tabla 3: Distintos compuestos ensayados para la inducción y concentraciones a las que se ensayaron en cada uno de los tres experimentos realizados.

Al cabo de tres horas del cultivo se centrifugaron los tubos durante 15 minutos a 3.000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5810 con rotor basculante para analizar la presencia de partículas fágicas tanto en los sobrenadantes como en los pellets mediante PCR.

3.5. Técnicas de ADN recombinante

3.5.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de las cepas de *L. parabuchneri* se realizó mediante una técnica rápida de extracción (Ruiz-Barba *et al.*, 2005), de la siguiente manera: Se centrifugaron 500 μ l de cultivo durante 15 minutos a 13.000 rpm en la centrífuga Eppendorf 5415R. Los pellets de células se resuspendieron en 200 μ l de Tris-EDTA a

los que se añadieron 200 µl de cloroformo, que rompe las células para liberar el ADN y actúa como fase orgánica en la que quedan retenidos los componentes celulares, quedando en la fase acuosa el ADN libre. Se centrifugó esta mezcla durante 15 minutos a 13.000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5415R y se recogió la fase acuosa, a un eppendorf nuevo.

Para realizar la extracción del plásmido para la clonación y la extracción de ADN para realizar la secuenciación del mismo se realizó mediante el método del SDS alcalino adaptado a *L. lactis* (Linares *et al.*, 2015). Estas modificaciones consistieron en cambiar la solución I en la que se resuspenden las células por una solución con sacarosa al 20%, Tris pH 8 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, lisozima a 10 mg/ml, y RNAsa a 40 µg/ml. Las células en esta mezcla de lisis se incubaron a 45°C durante 30 minutos. Posteriormente se siguió con el protocolo del SDS alcalino (Sambrook *et al.*, 1989)

3.5.2. PCR

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa tiene como objetivo amplificar un fragmento determinado de ADN que interese. En muchas ocasiones se usa para detectar presencia o ausencia de una secuencia en el ADN o para medir su tamaño. Esta técnica consiste en colocar el ADN con los componentes necesarios para su replicación y reproducir las condiciones necesarias para que se produzca. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl, usando como templado 1µl del DNA extraído por el método del cloroformo antes descrito. Además, la mezcla de la reacción contiene los dos oligonucleótidos más adecuados para el ensayo a realizar (Tabla 4) (2,5 µM), dNTPs (0,2 µM) y 0,5 unidades de DNA polimerasa (Dreamtaq, Thermo-Fisher) en el Buffer de reacción suministrado por la casa comercial. La reacción se realizó en un equipo MyCycler™ (Bio Rad) y se desarrolla en varias etapas: Al principio se calienta durante 5 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADN y que se separen las hebras. A continuación, se repiten tres ciclos de separación de hebras (20 s a 95°C), anillamiento (20 s a 48°C-55°C) y amplificación (1 min por Kb de producto esperado a 72°C). Tras el último ciclo, se deja un tiempo de elongación de 10 min a 72°C, para asegurar que todas las cadenas finalizan la polimerización. Finalmente, la temperatura baja a 4 grados para detener la reacción.

Nombre	Secuencia	Ensayo
pACE-seq	GTTATACTGAATTCGTTCCCAAG	Secuenciación clones
pNZ-seq	CTGCTGCTTTTTGGCTATCAATC	Secuenciación clones
P15707seqF	CTACCTATCCTGGTCTTAACAGC	Secuenciación lisina
P15707seqR	CTGTTCCATCGGCGTTTAAGTCGG	Secuenciación lisina
pACELysMNco	GTAGGAAGTGACGACCATGGCAAA AAAGG	Clonación lisina
pACELysMPst	ACCACTGCAGCTTATCACCAGCCT TACTGC	Clonación lisina
TestLysF	AGCCAACGGATTTACCAACG	Detección profago
TestLysR	GCTTTGTGTTGCTTCGTATAGG	Detección profago
TestInt	TGTAGCTTACCTACTATCTCG	Detección inducción
Testhol	AATGATCAAGCTGATTTGGATG	Detección inducción

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para los diferentes ensayos y su secuencia de bases. Todos los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo fueron sintetizados por la empresa Macrogen (Korea).

3.5.3. Visualización por electroforesis

Los productos de amplificación de la PCR se visualizaron tras electroforesis en geles de agarosa, tinción con bromuro de etidio y visualización con luz UV. Concretamente, 10 µl de la reacción de PCR se mezclaron con 2 µl de tampón de carga que contiene glicerol como densificante y un indicador de migración (azul de bromofenol). La mezcla se corrió en un gel de agarosa al 0,8 %, en TAE con ayuda de una fuente de alimentación *Bio-Rad*, a 135 V. durante 35 minutos. Tras la separación, el gel fue teñido con bromuro de etidio, un agente intercalante en el ADN que emite fluorescencia al excitarlo con luz UV, durante 15 minutos. Tras la tinción, se realizó la visualización en un transiluminador UV (SynGene) acoplado a una cámara digital.

3.5.4. Técnicas de clonación

Restricción de ADN

Las digestiones de ADN con los enzimas NcoI y PstI (Fermentas) se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante en cuanto al buffer más adecuado para cada enzima para conseguir la mayor actividad. Las digestiones se incubaron durante 2 horas a 37°C en una estufa. La visualización de los fragmentos resultantes se realizó por electroforesis y visualización con luz UV como se indicó anteriormente.

Ligación

Tras cortar con los mismos enzimas el plásmido (pACE; Linares *et al.*, 2015) y el inserto (*LysM*) generado por PCR que queremos clonar, de forma que se generen extremos que sean complementarios, se procedió a realizar la ligación de los mismos. Lo ideal es tener aproximadamente 4 veces más cantidad del ADN que se quiere clonar que de plásmido. Se realizó la reacción de ligación añadiendo 70 μl de ADN del inserto y 9 μl del plásmido digerido, 1/10 del volumen de buffer de ligación, 1 μl del enzima ligasa (Fermentas) y se completó con agua hasta un volumen total de 100 μl . La reacción se incubó a 16°C *o/h* para asegurar una mayor efectividad de ligación.

Tras la ligación, el DNA se precipitó añadiendo 1/10 del volumen de acetato sódico 3M pH 4,8 y 2 volúmenes de etanol y se mantuvo a -20°C durante media hora. Posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm y 4°C en una centrífuga eppendorf 5841R. El pellet se lavó con etanol al 70% y tras secarlo al vacío se resuspendió en 2 μl de agua que se utilizó para transformar *L. lactis* NZ9000 mediante electroporación.

Transformación por electroporación

Para realizar la transformación, se siguió el protocolo de De Vos *et al.*, (1989) y se electroporaron 50 μl de células con 2 μl de ADN fijando los parámetros a 10000 v/cm, 25 μf y 200 ohmios con un equipo *Gene Pulser XCel* (Bio-Rad) en cubetas de electroporación de 0.2 cm. Tras la electroporación, se resuspendieron las células en 950 μl de medio SGM17 frío y se incubaron las bacterias a 32°C durante 1,5 horas para asegurar la recuperación de la pared celular. Finalmente, se sembró el cultivo en 4 placas de SGM17, suplementado con un 2% de agar y cloranfenicol a 5 $\mu\text{g/ml}$, en césped (50 μl , 200 μl , 250 μl y 400 μl).

Secuenciación de ADN

La secuenciación de los productos de PCR se realizó tras purificarlos mediante el Kit de purificación de fragmentos de PCR ATP™ Gel/PCR Extraction Kit (ATP™ Biotech Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación fue llevada a cabo por la empresa MacroGen (Korea), a la que se enviaron dos eppendorf por cada muestra, una por cada uno de los dos oligonucleótidos utilizados en la PCR, en los que se mezclan 7,5 μl de ADN amplificado por PCR y 2,5 μl del oligo correspondiente.

Los resultados de la secuenciación se descargaron desde la página web de la empresa y se manejaron con el programa informático Vector NTI v.9 (Invitrogene).

3.6. Técnicas de producción de proteínas

3.6.1. Inducción de la Lisina del profago 1 de *L. parabuchneri*

La cepa *L. lactis* NZ9000-pACE-LysMLpb10, obtenida en el presente trabajo, se creció *o/n* en GM17 suplementado con 5 µg/ml de cloranfenicol. Al día siguiente, este cultivo se utilizó para inocular al 1% v/v 100 ml de GM17 con 5 µg/ml de cloranfenicol y suplementado con 20 mM agmatina (agente inductor). Se incubó durante 16 h a 30°C en una estufa. Tras este tiempo, se centrifugaron las células en una centrifuga Kubota a 10.000rpm y 4°C, las células se resuspendieron en 5 ml de buffer de lisis del Kit de purificación de proteínas QuiExpresionist (Quiagén) y se rompieron en una french press (Constant Cell Disruption Systems) dando dos pases a 2.500 bares. Este extracto se centrifugó a 10.000 rpm en una centrifuga Kubota para obtener las fracciones solubles e insolubles. Ambas fracciones se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE (Laemli, 1970) en un miniprotean II (BIORAD), posteriormente se visualizaron tras tinción de comassie en un transiluminador acoplado a una cámara digital (SynGene).

3.7. Análisis de profagos

Se analizó el genoma de las cepas DSM5707 y DSM15352 de *L. parabuchneri* disponibles en las bases de datos (NCBI) en busca de profagos. Así como los genomas de las cepas de *L. parabuchneri* 10 y 2E5-1 disponibles en el laboratorio durante el desarrollo del presente master. Para ello, se buscaron secuencias relacionados con bacteriófagos en la anotación disponible en el servidor RAST (Aziz *et al.*, 2008) al cual se subieron las secuencias genómicas antes mencionadas. El análisis de las secuencias genómicas una vez localizadas se realizó con el programa *Artemis* (versión 13.2.0), el cual, además indica las secuencias codificantes con los productos conocidos para algunas de ellas. Para las secuencias cuyo producto no estaba identificado se buscaron similitudes utilizando el programa BLAST® (Altschul *et al.*, 1997).

Se diseñaron primers específicos (Tabla 4) con ayuda del programa *Clone Manager suite 7* para secuenciar una zona del profago de la cepa DSM5707 desconocida.

Con estos datos, se elaboraron mapas genómicos de los profagos utilizando el programa Vector NTI v.9 (Invitrogene) y árboles filogenéticos con el programa Seeview (Gouy *et al.*, 2010) a partir de un alineamiento realizado con el programa Clustal (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) en el EBI (The European Bioinformatics Institute).

*Resultados y
Discusión*

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo se ha centrado en la búsqueda de bacteriófagos que, aislados a partir de muestras de quesos comerciales, fuesen capaces de infectar a distintas cepas de *L. parabuchneri*, principal responsable de la acumulación de histamina en productos lácteos, pudiendo de este modo, ser utilizados para reducir la concentración de este compuesto tóxico en quesos. Por otro lado, se han analizado los genomas de cuatro cepas de *L. parabuchneri* con el fin de encontrar y analizar la presencia de profagos. A continuación, se intentó la inducción de estos profagos con dos compuestos diferentes, mitomicina C y ciprofloxacina. Finalmente, se realizó la clonación y sobreproducción de una lisina fágica, enzima encargado de producir la lisis celular al final del proceso de infección.

4.1. Contenido de AB en muestras de queso

De forma previa al aislamiento de bacteriófagos de *L. parabuchneri* a partir de muestras de quesos comerciales, se procedió a analizar el contenido en ABs de las mismas. Este análisis se llevó a cabo mediante técnicas cromatográficas de UPLC, para determinar el contenido de manera directa.

En la figura 9 se presenta un ejemplo de cromatograma obtenido mediante UPLC a partir de una muestra de queso cabrales, utilizado en la búsqueda de bacteriófagos, por otro lado, en la tabla 5 se muestra la concentración de las diferentes aminas encontradas en los quesos utilizados para dicho fin.

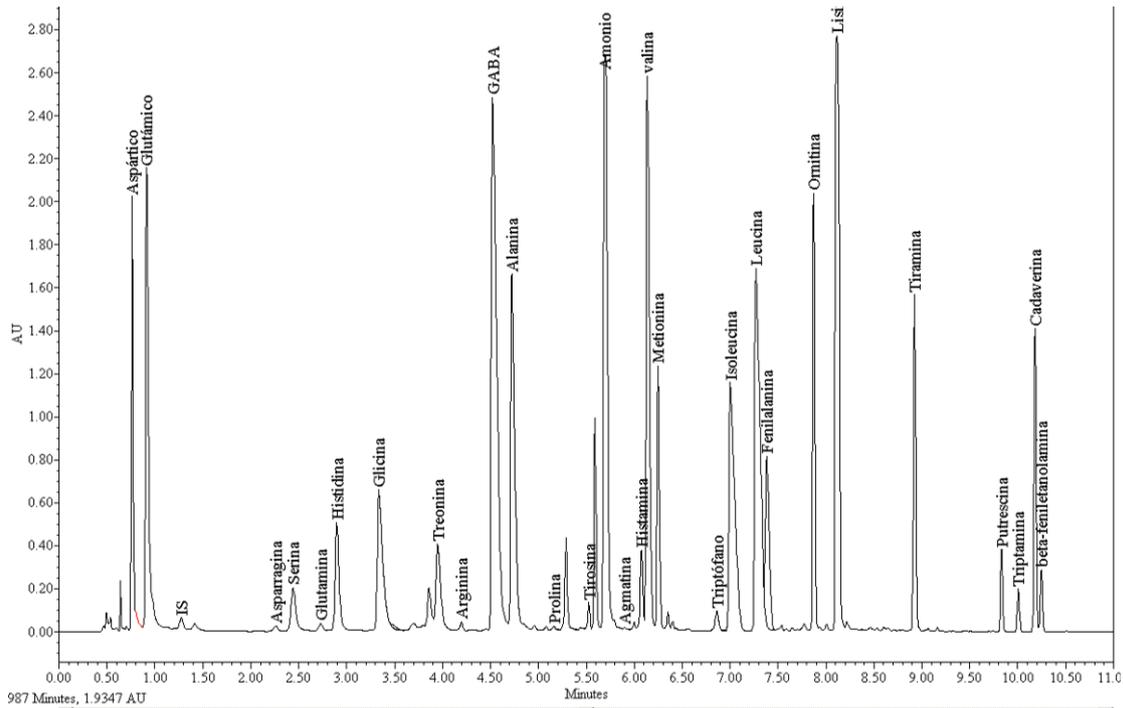


Figura 9: Cromatograma obtenido a través de un análisis UPLC de la muestra de queso cabrales utilizada en la búsqueda de bacteriófagos. En él se indican los picos correspondientes a AAs y ABs.

Los resultados de la cuantificación por UPLC de aminas biógenas en las muestras de queso analizadas muestran una gran diversidad en cuanto a la concentración y variedad de ABs. Así, el contenido total de ABs varía entre la ausencia de ABs en una muestra de emmental y los 9.300 mg/kg de la muestra de Cabrales. Los datos reflejados en la Tabla 5 muestran que la tiramina es la AB mayoritaria en las muestras que queso analizadas, tanto por frecuencia como por concentración. La muestra de queso con la mayor presencia de ABs, tanto cualitativa como cuantitativamente, fue la correspondiente a un queso de cabrales, en la que se detectó la presencia de las seis ABs analizadas y con las mayores concentraciones. Por otro lado, la muestra correspondiente a un queso emmental no se detectó la presencia de ninguna AB.

En la tabla 5 se puede observar que la segunda ABs más frecuentemente detectada fue la β -feniletilamina, detectada también en 4 de las 6 muestras de queso, si bien las concentraciones detectadas fueron menores que para la tiramina. La tiramina se encontró en un rango de entre 323,74 y 4.909,67 mg/Kg, en las muestras en las que estaba presente, mientras que las muestras en las que se ha detectado β -feniletilamina presentaron un rango de concentraciones de entre 3,63 y 824,02 mg/Kg.

La tercera AB con mayor presencia en las muestras fue la putrescina, que fue detectada en tres muestras, con concentraciones que varían entre 95,20 y 362,29

mg/Kg, Por su parte, histamina, triptamina y cadaverina fueron detectadas en dos muestras cada una. La histamina se detectó en las muestras de queso cabrales y monterrubio con unas concentraciones de 915,13 y 11,11 mg/Kg respectivamente. La triptamina fue también detectada en las mismas muestras de queso cabrales y monterrubio en concentraciones de 607,21 y 73,69 mg/Kg respectivamente. Finalmente, la cadaverina se detectó en la muestra de queso cabrales y de oveja, con unas concentraciones de 1.767,67 y 190,05 mg/Kg respectivamente.

Muestras de Quesos	HMA (mg/Kg)	TMA (mg/Kg)	PUT (mg/Kg)	TRP (mg/Kg)	CAD (mg/Kg)	PHE (mg/Kg)	Total (mg/Kg)
Emmental	ND						
Emmental rallado	ND	323,74	ND	ND	ND	16,96	340,71
Cabrales	915,13	4.909,67	362,29	607,21	1.767,67	824,02	9.386,02
Oveja	ND	326,48	120,76	ND	190,05	ND	637,3
Roquefort	ND	ND	ND	ND	ND	3,63	3,63
Monterrubio	11,11	1.747,67	95,20	73,69	ND	30,29	1.946,86

Tabla 5: Concentración de las diferentes ABs encontradas en las muestras de queso utilizadas para el trabajo. HMA: Histamina, TMA: Tiramina; PUT: putrescina; TRP: Triptamina; CAD: Cadaverina; PHE: β-feniletilamina; ND: No detectado.

Si tenemos en cuenta las recomendaciones en cuanto a seguridad para el consumo respecto a la presencia de ABs en quesos podemos ver que la mayoría de las muestras analizadas deberían considerarse como potencialmente peligrosas para el consumo (EFSA, 2011). Solo las muestras de emmental y roquefort presentan un contenido suficientemente bajo como para ser consideradas seguras. En las otras cuatro muestras analizadas, se detectan concentraciones de ABs por encima de los límites propuestos, tanto a nivel individual como respecto al contenido total de ABs. Aun así, hay que recordar que a pesar de las altas concentraciones de ABs observadas no existe legislación específica sobre los límites máximos de la presencia de ABs en productos lácteos.

Para la tiramina se ha propuesto un límite de toxicidad de 125 g/Kg o un valor umbral de 100 mg/Kg ya que en esos valores se han detectado algunos síntomas de intoxicación, aunque la mayoría de autores coinciden en establecer un límite tolerable de 500 mg/Kg (Ladero *et al.*, 2010). En la tabla 5 se puede comprobar que todas las muestras de queso en las que se detecta tiramina, su concentración se encuentra muy

por encima de estos límites. Se ha visto que la concentración a la que el 50% de los individuos sanos responde con alguna sintomatología es de 1100 mg/Kg (EFSA, 2011), superando este límite las muestras de cabrales y monterrubio.

Por su parte, la histamina puede provocar los primeros síntomas de intoxicación con dosis superiores a 75 mg, dosis superiores a 400 mg/Kg son consideradas peligrosas y superiores a 1000 mg/Kg podrían causar reacciones muy severas (Ladero *et al.*, 2010). La muestra de cabrales supera los dos primeros límites y se queda muy cerca del tercero, concentración que se considera inaceptable (Ladero *et al.*, 2010).

Por otro lado, para la β -feniletilamina se ha propuesto un límite de 30 mg/Kg (Ladero *et al.*, 2010), ya que se los síntomas de intoxicación se pueden manifestar a partir de los 5 mg/Kg (EFSA, 2011). Dos muestras superarían el límite propuesto, la de monterrubio, aunque por muy poca cantidad, y la de cabrales, que lo supera en más de 25 veces.

El análisis del contenido de ABs en las muestras de queso ha puesto de manifiesto que éstas se pueden encontrar en concentraciones muy elevadas, por lo que es necesario tomar medidas preventivas para reducir este contenido con el objetivo de reducir las intoxicaciones alimentarias relacionadas con el consumo de ABs y de este modo mejorar la calidad de los alimentos.

4.2. Búsqueda de bacteriófagos que infecten BAL

Aunque solamente en dos de las muestras analizadas se detectó la presencia de histamina por encima del límite de detección del UPLC, lo que garantiza la presencia de cepas productoras de histamina, se procedió a intentar el aislamiento de bacteriófagos frente a cepas de *L. parabuchneri*, la principal bacteria responsable de la acumulación de ABs en queso (Díaz *et al.*, 2016a), en todas las muestras disponibles.

Para los cultivos de enriquecimiento se utilizaron como hospedadores 16 cepas diferentes de *L. parabuchneri*, productoras de ABs, pertenecientes a la colección del grupo de Microbiología Molecular del IPLA, aisladas mayoritariamente a partir de quesos (Tabla 2).

Se siguió el protocolo detallado en el apartado 3.3 y se obtuvieron placas de inhibición del crecimiento en las placas de las cepas MZ38, MZ78 y MZ84 a partir de todas las

muestras de queso en las que se utilizó para el enriquecimiento la mezcla de las cepas DSM5987, C10, C14 y MZ38.

El hecho de observar halos de inhibición a partir de todas las muestras y sobre las mismas cepas, indicaría que podrían estar causados no por un bacteriófago si no por la presencia de alguna sustancia inhibitoria para la que las cepas MZ38, MZ78 y MZ84 fuesen más sensibles. Para comprobar la presencia o no de fagos en las muestras se procedió a sembrar por agotamiento estos sobrenadantes por el método de la doble capa. Si hubiese bacteriófagos se observaría la aparición de placas de lisis individuales, mientras que si se tratase de una sustancia inhibitoria se observaría una disminución del halo de inhibición a medida que se diluye la muestra, como efectivamente así fue. Concluyéndose que en los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de enriquecimiento no había bacteriófagos capaces de infectar a las cepas de *L. parabuchneri* ensayadas. Se trató de averiguar la naturaleza de la sustancia inhibitoria presente en la muestra.

Se ensayaron los sobrenadantes de cultivos o/n de las cepas presentes en la mezcla inicial, *L. parabuchneri* DSM5987, C10, C14 y MZ38, observándose halo de inhibición en los sobrenadantes correspondientes a las cepas C10 y C14. Se observó que el pH del medio correspondiente a las cepas C10 y C14 era algo más ácido que el de las otras dos cepas, por lo que para comprobar si la acidez era la responsable de la inhibición del crecimiento se ajustó el pH de estos sobrenadantes con NaOH para igualarlo al del resto de cepas, pero seguía existiendo halo de inhibición, por lo que se descartó que la acidez del medio fuese la responsable. Posiblemente se trate de algún compuesto del metabolismo secundario de estas cepas que no fue posible identificar.

No se pudo encontrar ningún bacteriófago capaz de infectar a las cepas de *L. parabuchneri* ensayadas. En el caso de las muestras en las que no se detectó la presencia de histamina podría deberse a la ausencia de fagos en ellas, ya que, al no haberse detectado histamina, no se puede asegurar la presencia de bacterias productoras. En el caso de las dos muestras en las que, si se detectó histamina y por tanto contendrían bacterias productoras, el hecho de no haber aislado ningún fago podría deberse a que no se hubiesen utilizado cepas susceptibles a su infección, ya que en general los fagos que infectan a BAL tienen un rango de hospedador muy estrecho, infectando en algunos casos a una única cepa (Caso *et al*, 1995).

4.3. Análisis profagos

Dado que no se logró aislar ningún bacteriófago capaz de infectar las cepas ensayadas de *L. parabuchneri*, a partir de las muestras de queso ensayadas, se decidió buscar una estrategia alternativa. Así, se realizó un análisis de los dos genomas de *L. parabuchneri* disponibles en la base de datos, DSM5707 y DSM15352, en busca de la existencia de profagos en los mismos. La presencia de profagos en estos genomas nos abriría la posibilidad a inducir las cepas disponibles en el laboratorio con el objeto de obtener fagos capaces de infectar a *L. parabuchneri* y por otro lado el análisis de la secuencia genómica de los mismos nos permitiría identificar genes que codificasen proteínas con potencial antimicrobiano, que podrían ser utilizadas frente a cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina.

4.3.1. Análisis genómico de profagos de *L. parabuchneri*

Se realizó una búsqueda de secuencias relacionadas con bacteriófagos en los genomas de las cepas DSM5707 y DSM15352 de *L. parabuchneri* disponibles en la base de datos de genomas del NCBI y depositadas en el servidor RAST (Aziz *et al.*, 2008). En la cepa DSM15352 se encontró una secuencia continua que correspondía a un profago (Figura 11 a). En la cepa DSM 5707 se encontraron 2 secuencias en dos *contigs* separados. El análisis de la secuencia indicaba que probablemente perteneciesen al mismo profago, por lo que se decidió comprobarlo mediante amplificación por PCR. Para ello se diseñaron dos oligonucleótidos P15707seqF y P15707seqR (Tabla 4), en los extremos de la secuencia para realizar una amplificación por PCR. Se obtuvo una banda de PCR de aproximadamente 1500 pb, que se purificó y se envió a secuenciar tal y como se indica en el apartado de materiales y métodos. La secuencia obtenida se utilizó para obtener una única secuencia continua del profago de *L. parabuchneri* DSM 5707 (Figura 11 b) con la ayuda del programa informático de análisis y procesamiento de secuencias *Artemis* (versión 13.2.0).

Por otro lado, se realizó una comprobación y mejora de la anotación de los genes de ambos profagos mediante la comparación de cada uno de ellos frente a las secuencias depositadas en el NCBI, utilizando el programa BLAST® (Altschul *et al.*, 1997). Gracias a estas comparaciones, se obtuvo la información más actualizada sobre los genomas de los profagos de ambas cepas y se pudo asignar una posible función a varios genes anotados como proteínas hipotéticas de función desconocida (Tablas A.1 y A.2 del

anexo). Esta información se incorporó a las secuencias con el programa Artemis y posteriormente se utilizó el programa Vector NTI v.9 (Invitrogene) para obtener los mapas genómicos de ambas cepas que se presentan en la figura 11.

4.3.2. Diseño de Tests por PCR

Mediante la comparación de la secuencia nucleotídica de los genomas de ambos profagos se buscaron regiones muy conservadas con el objetivo de diseñar primers en estas regiones y poder testar la presencia de profagos en las cepas disponibles en el laboratorio de Microbiología Molecular del IPLA. Los oligonucleótidos, TestLysF, TestLysR (Tabla 4), fueron diseñados con ayuda del programa informático de análisis de secuencias Clone Manager v.9 (Sci Ed Central).

Mediante PCR utilizando los oligonucleótidos TestLysF, TestLysR se comprobó que todas las cepas ensayadas y que habían sido utilizadas como cepas hospedadoras en la búsqueda de fagos en muestras de quesos contenían profagos en su genoma (Figura 10). El hecho de que todas las cepas contengan al menos un profago es un punto importante para el desarrollo del presente trabajo, ya que una de las características de la presencia de profagos en las cepas es que las hace resistentes a la infección por parte de fagos similares. Lo que podría explicar en parte el hecho de que no se hubiesen aislado fagos durante su búsqueda en las muestras analizadas en el presente trabajo.

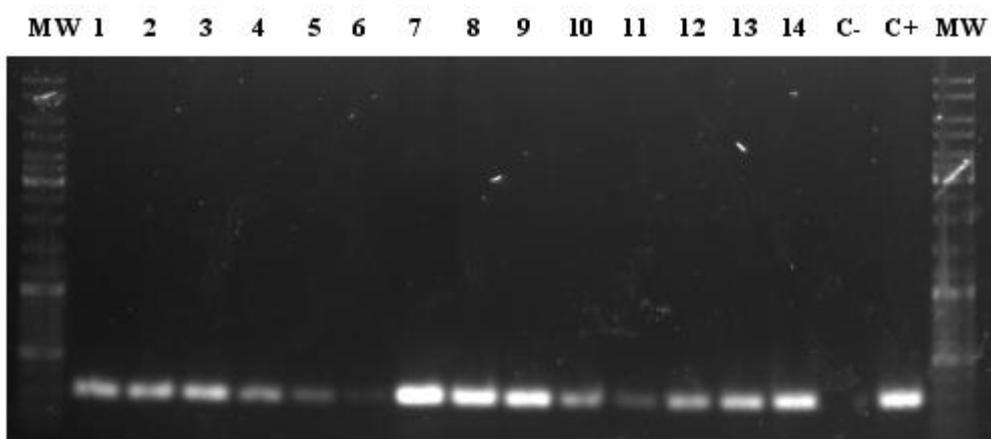


Figura 10: Resultado del test de PCR para la presencia de profagos en las cepas de *L. parabuchneri* realizada con los oligonucleótidos TestLysF y TestLysR. MW: Marcador de peso molecular, C-: Control negativo, C+: Control positivo, Cepas: 1: C14, 2: Z1-1, 3: DSM5987, 4: 2E5-1, 5: DSM5707, 6: 2E6-1, 7: MZ84, 8: B301, 9: MZ78, 10: 2E13, 11: 2E9-1, 12: 2E8, 13: 10, 14: MZ38.

Durante el desarrollo de este trabajo, en el laboratorio de Microbiología Molecular del IPLA se obtuvo la secuencia genómica de dos de las cepas utilizadas como hospedadores *L. parabuchneri* 10 y 2E5-1. Dado que en ellas se había detectado la presencia de profagos (Figura 10 Calles 4 y 13), su secuencia genómica se analizó en busca de los mismos, del mismo modo que se describió en el apartado anterior. De esta forma se obtuvieron los mapas genómicos para estas cepas, presentados igualmente en la figura 11. En la cepa *L. parabuchneri* 2E5-1 se detectó una secuencia continua, correspondiente a un profago (Figura 11 E), mientras que en la cepa *L. parabuchneri* 10 se detectaron dos secuencias, correspondientes a dos profagos (Figura 11C y D).

4.3.3. Análisis de la secuencia de profagos de *L. parabuchneri*

Tras realizar el análisis bioinformático de los genomas, se obtuvieron los mapas genómicos que se presentan en la figura 11.

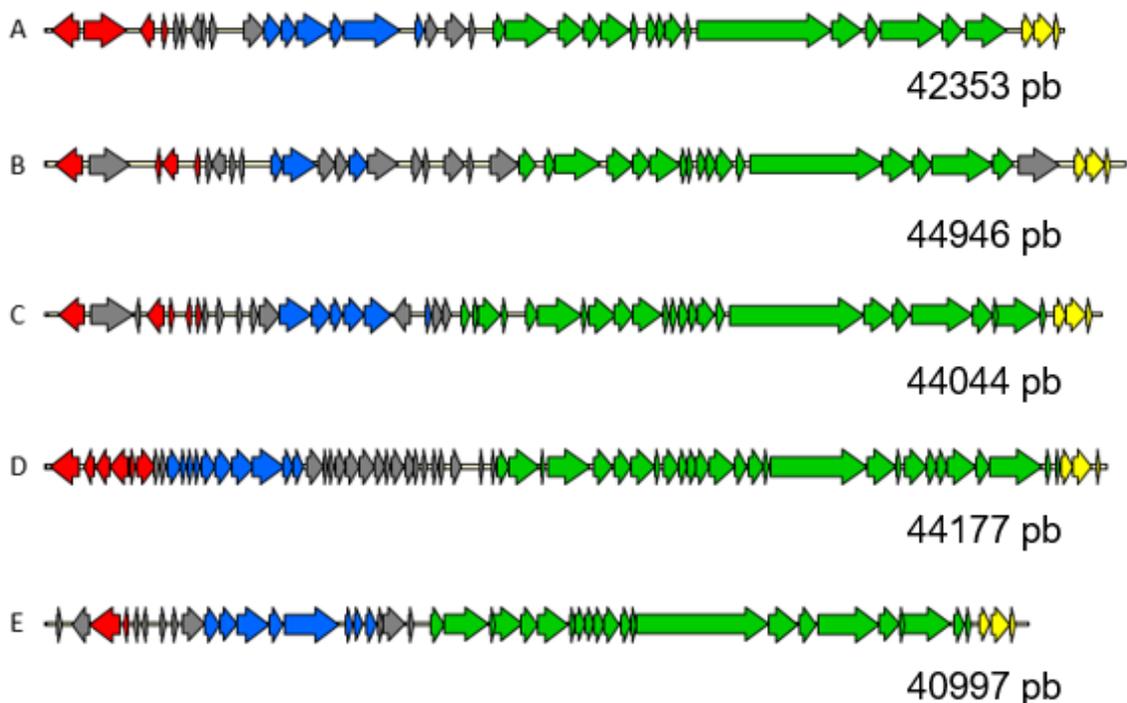


Figura 11: Mapas genómicos de los profagos de *L. parabuchneri* analizados y tamaño. A: Profago 1 de la cepa DSM15352, B: Profago 1 de la cepa DSM5707, C: Profago 1 de la cepa 10, D: Profago 2 de la cepa 10, E: Profago 1 de la cepa 2E5-1. Rojo: Genes de lisis/lisogenia, Azul: Genes de Replicación, Verde: Genes estructurales, Amarillo: Genes de lisis, Gris: Función desconocida.

Todos los bacteriófagos presentaron tamaños similares, presentando el mayor tamaño el profago de la cepa DSM5707 con 44.946 pares de bases y el menor tamaño el profago de la cepa 2E5-1 con 40.997 pares de bases. Los genomas de estos fagos serían algo mayores que la mayoría de los que se han identificado en especies de *Lactobacillus*, que oscilan entre 37 y 42 kb, aunque se han identificado fagos en *L. plantarum* con tamaños de hasta 80 kb (Caso *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1988).

En aquellos casos en los que se pudo asignar una función a los genes, ésta se indicó en la Figura 11, asignando un código de colores en función de la fase del ciclo de vida en el que participan.

En rojo, se presentan los genes implicados en el establecimiento del ciclo lisogénico, tanto en la inserción del material genético del fago en el ADN bacteriano como en el mantenimiento de la lisogenia. En azul, se indican los genes implicados en la replicación del DNA fágico durante el ciclo lítico. En verde, aparecen los genes responsables de la síntesis de los componentes estructurales del fago, estos genes están ordenados dependiendo de la zona estructural en la que participan (cabeza, cuello y cola). Al final de las secuencias genómicas, en amarillo, se encuentran los genes responsables de la lisis de la bacteria, que permite la liberación de la progenie del virus una vez que ha concluido el ciclo lítico. En gris se indican los genes para los que la función de sus productos es desconocida (Figura 11). En la Figura 11 se puede observar por un lado que los genes que participan en funciones relacionadas están agrupados en módulos, módulo lisis/lisogenia, replicación, ensamblaje de las cabezas y colas, y lisis celular. Esta organización modular se ha observado en otros bacteriófagos tanto de bacterias lácticas como de otras bacterias (García *et al.*, 2003). Esta organización se postula que es una forma de aumentar la eficiencia durante el proceso infectivo del bacteriófago, así como una forma de aumentar la variabilidad y la evolución de los fagos ya que estos módulos podrían intercambiarse entre fagos similares generando nuevos fagos con nuevas propiedades o mayor capacidad de infección.

Se realizó un árbol filogenético de los genomas de los profagos de *L. parabuchneri* a fin de compararlos (Figura 12). Se pueden observar dos grupos, por un lado, se agrupan los profagos P1-2E51, P1-DSM15352, P1-Lpb10 y P1-DSM5707 y por otro lado el profago P2-Lpb10. Los profagos más similares son los que se habrían detectado con la PCR diseñada en el apartado anterior (con los oligonucleótidos TestLysF TestLysR) y que estarían presentes en todas las cepas analizadas. El profago P2-Lpb10 sería diferente al resto, lo cual explica por qué puede coexistir con

el profago P1-Lpb10 en la misma cepa. Como se mencionó anteriormente la existencia de un profago en una cepa le confiere inmunidad a la infección por otros fagos similares, pero no excluye la posibilidad de infección por fagos diferentes, lo que parece haber ocurrido en este caso. La existencia de varios profagos en las cepas de bacterias del ácido láctico es un hecho habitual habiéndose detectado la presencia de hasta 6 profagos diferentes en una misma cepa, aunque en muchos casos no todos ellos son completamente funcionales (Chopin *et al.*, 2001).

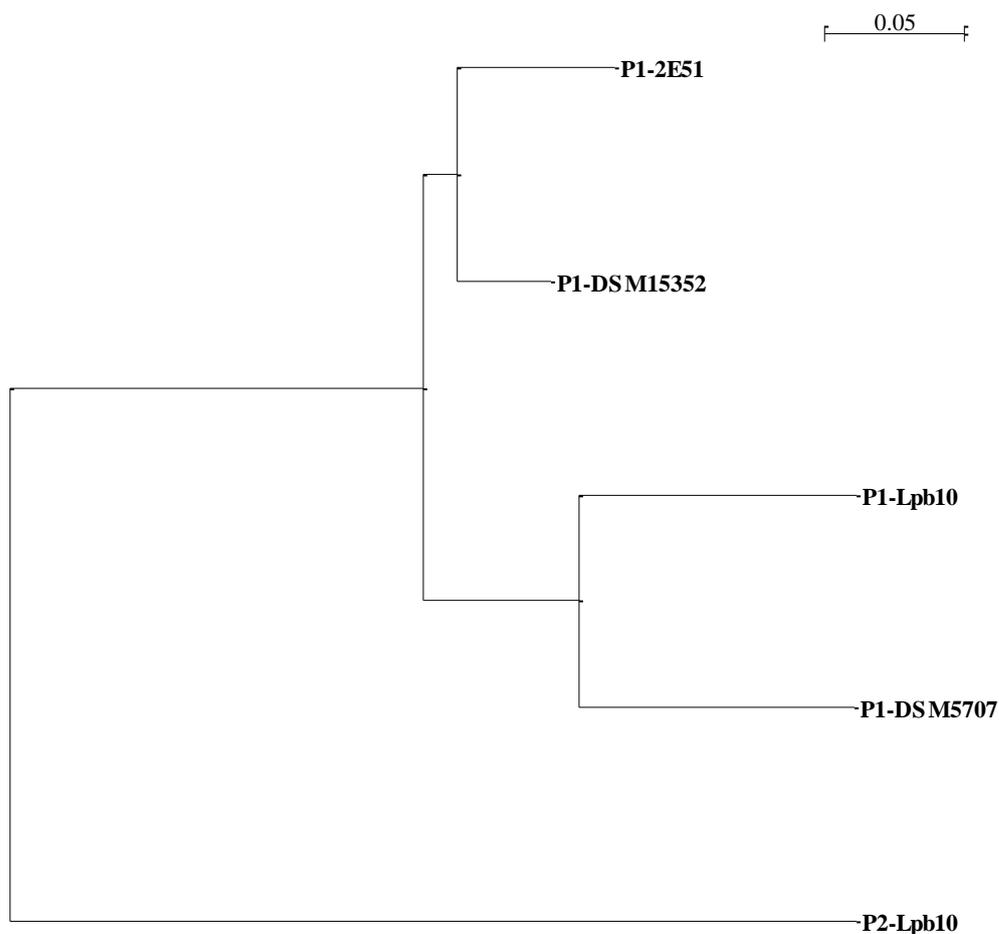


Figura 12: Árbol filogenético de las secuencias genómicas de los diferentes profagos de *L. parabuchneri* analizados.

4.4. Inducción profagos

Tras comprobar la presencia de profagos en todas las cepas de *L. parabuchneri* y dado que se disponía de la secuencia genómica de las cepas 10 y DSM5707 se procedió a intentar inducir los profagos de las mismas. En vista de la similitud que

presentan los profagos entre todas las cepas analizadas se procedió a diseñar unos oligonucleótidos que nos permitiesen detectar la inducción de los mismos, aun en ausencia de una cepa indicadora (si todas las cepas contienen el profago, todas ellas serían resistentes a la infección por parte del fago inducido).

Para ello se utilizó el programa informático Clone Manager v.9 para diseñar oligonucleótidos en los extremos de la secuencia fágica y además en orientación divergente: TestHol y TestInt (Tabla 4). Cuando se induce el ciclo lítico en células lisogénicas, se produce la liberación del genoma del profago del genoma bacteriano, recircularizándose para facilitar el proceso de replicación del mismo (Figura 13). De este modo, si hay inducción del profago, los oligonucleótidos diseñados en los extremos del genoma y en posición divergente (Figura 13-1), pasarían a estar en posición convergente (Figura 13-2) y a poca distancia, lo que permitiría obtener una amplificación por PCR.

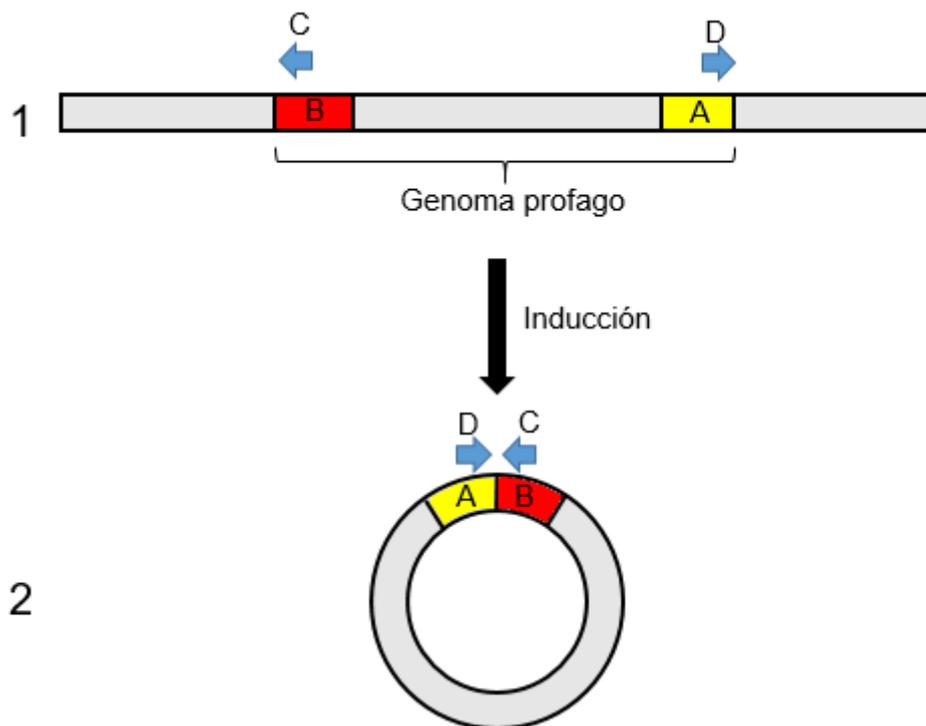


Figura 13: Genoma del profago antes (1) y después (2) de su recircularización tras la inducción y posición de los primers en cada caso. A: Gen de la holina, B: Gen de la integrasa, C: Primer TestInt D: Primer TestHol.

Siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos, se intentó la inducción con dos compuestos, Mitomicina C y Ciprofloxacina, a diferentes concentraciones de los mismos y en distintos puntos de la fase de crecimiento de las cepas hospedadoras *L. parabuchneri* 10 y DSM5707 (Tabla 3). Se espera que estos compuestos inductores

entren en la célula e interfieran en el mantenimiento del ciclo lisogénico, de modo que se desencadene el ciclo lítico, la transcripción de los genes de replicación, estructurales y de lisis, provocando la formación de partículas fágicas que se liberarán al medio. De tal forma que se podrían detectar en los sobrenadantes de cultivo mediante la PCR diseñada (Figura 13). Dado que se desconoce la duración del ciclo lítico, de modo complementario se realizó la PCR de los pellets celulares, por si éste no hubiese finalizado y las partículas fágicas estuviesen aún en el interior celular sin ser liberadas por la acción de la lisina fágica al final del ciclo lítico de los fagos (Figura 14).

Además, para descartar que un resultado negativo de la PCR se debiese a la presencia de sustancias inhibitorias en los sobrenadantes o los pellets, se realizó un control positivo utilizando las mismas muestras y los oligonucleótidos TestLysF/R (Tabla 4 y Figura 14), que detectarían la presencia de DNA del profago independientemente de que se indujera o permaneciese como profago en el genoma bacteriano.

Se realizaron tres ensayos independientes con cada compuesto inductor, utilizando distintas concentraciones de los compuestos en cada uno de los ensayos y en las dos cepas (Tabla 3). De todos los ensayos se recogieron los sobrenadantes tras dos horas de incubación con el agente inductor y los pellets celulares, de los cuales fue necesario extraer el ADN mediante el método del cloroformo (Ruiz-Barba *et al.*, 2005). En la figura 14 se muestra, como resultado representativo de todos los ensayos realizados, el correspondiente a la inducción de la cepa *L. parabuchneri* 10 con distintas concentraciones de mitomicina C.

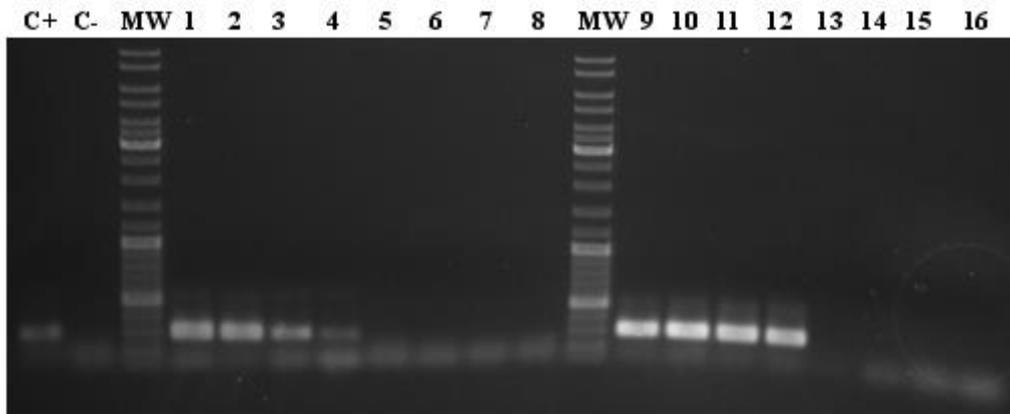


Figura 14: Resultado de las PCR con TestLysF/R y con TestHol/Int tras la inducción de *L. parabuchneri* 10 con mitomicina C. C+: Control positivo, C-: Control negativo, MW: Marcador, 1: TestLysF/R pellet cepa 10 sin compuesto, 2: TestLysF/R pellet cepa 10 con 1 µg/ml de mitomicina C, 3: TestLysF/R pellet cepa 10 con 5 µg/ml de mitomicina C, 4: TestLysF/R pellet cepa 10 con 10 µg/ml de mitomicina C, 5: TestHol/Int pellet cepa 10 sin compuesto, 6: TestHol/Int pellet cepa 10 con 1 µg/ml de mitomicina C, 7: TestHol/Int pellet cepa 10 con 5 µg/ml de mitomicina C, 8: TestHol/Int pellet cepa 10 con 10 µg/ml de mitomicina C, 9: TestLysF/R sobrenadante cepa 10 sin compuesto, 10: TestLysF/R sobrenadante cepa 10 con 1 µg/ml de mitomicina C, 11: TestLysF/R sobrenadante cepa 10 con 5 µg/ml de mitomicina C, 12: TestLysF/R sobrenadante cepa 10 con 10 µg/ml de mitomicina C, 13: TestHol/Int sobrenadante cepa 10 sin compuesto, 14: TestHol/Int sobrenadante cepa 10 con 1 µg/ml de mitomicina C, 15: TestHol/Int sobrenadante cepa 10 con 5 µg/ml de mitomicina C, 16: TestHol/Int sobrenadante cepa 10 con 10 µg/ml de mitomicina C.

Como se puede apreciar, el resultado de la inducción que se muestra en la figura 14 fue negativo, ya que no se produjo amplificación por PCR con los oligonucleótidos TestHol y TestInt (Calles 5 a 8 y 13 a 16). Este resultado negativo no se debe a la presencia de sustancias inhibitorias ya que se observó amplificación de la PCR realizada con los oligonucleótidos TestLysF/R, tanto en sobrenadantes como pellets, que corroborarían la presencia de profagos en las células, lo que quiere decir que no se produjo la circularización del genoma fágico debido a que la inducción no tuvo éxito.

Se descartó que la falta de inducción se debiera a que los compuestos inductores utilizados, mitomicina C y Ciprofloxacina inhibiesen el crecimiento celular de las cepas ensayadas, ya que por un lado se utilizó un rango de concentraciones amplio de 1 µg/ml a 200 µg/ml y por otro se había realizado un seguimiento de la densidad óptica de los cultivos con y sin la presencia del agente inductor, no observándose diferencias entre ambos cultivos (Tabla 6).

Cantidad inoculada (µl)	DO inicial	DO tras inducción durante 2 horas		
		Sin compuesto	2 µg/ml	20 µg/ml
50	1,025	1,588	1,620	1,620
15	0,573	1,223	1,219	1,202
1	0,184	0,565	0,599	0,547

Tabla 6: Densidades ópticas de cultivos de *L. parabuchneri* DSM5707 iniciales y con diferentes concentraciones de ciprofloxacina tras dos horas de inducción. NE: No ensayado.

La ausencia de inducción se podría achacar a que no hubiésemos utilizado los agentes inductores adecuados, o que no los hubiésemos aplicado en la fase de crecimiento adecuada. Sin embargo, en este caso se utilizaron en un rango de concentraciones y de fases de crecimiento que coinciden con las más utilizadas para la inducción de bacteriófagos de bacterias del ácido láctico en general y de *Lactobacillus* en particular (Ladero *et al.*, 1998), pero dado el desconocimiento que existe sobre los fagos que infectan a *L. parabuchneri*, de hecho, no existe en la literatura ninguna descripción sobre fagos que infecten a esta especie, no se puede descartar esta posibilidad. También se podría pensar que no se utilizó compuesto inductor en concentración suficiente para lograr la inducción, sin embargo, se fue aumentando la cantidad ensayada, hasta hacerlo con una concentración de 200 µg/ml, 100 veces mayor que la concentración más usada para la inducción de profagos de lactobacillus, sin obtener ningún resultado de inducción. Por lo tanto, es poco probable que este sea el motivo.

4.5. Clonación e inducción de una lisina fágica

Finalmente, dado que no se pudo aislar ningún fago capaz de infectar *L. parabuchneri*, se decidió realizar un análisis de los genes presentes en los genomas de los profagos para identificar genes que codificasen proteínas con potencial antibacteriano. En todos los genomas se identificó la presencia de un gen que codificaría una lisina (*LysM*). Como se explicó en el marco teórico (2.4.5), la lisina es el enzima encargado de lisar las células para liberar la progenie viral, por ello se podría utilizar como método de eliminación de *L. parabuchneri* productores de histamina en alimentos. Para ello es necesario obtenerla en altas concentraciones, por lo que se decidió clonar el gen en un plásmido de sobre-expresión (pACE; Linares *et al.*, 2015) en *L. lactis*. En primer

lugar, se identificaron los genes *LysM* en los profagos y se realizó una comparación de la secuencia aminoacídica de las proteínas codificadas por ellos utilizando el programa Clustal (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Con este alineamiento se realizó un árbol filogenético con la ayuda del programa seaview (Gouy *et al.*, 2010) para ver las diferencias existentes entre ellas (Figura 15).

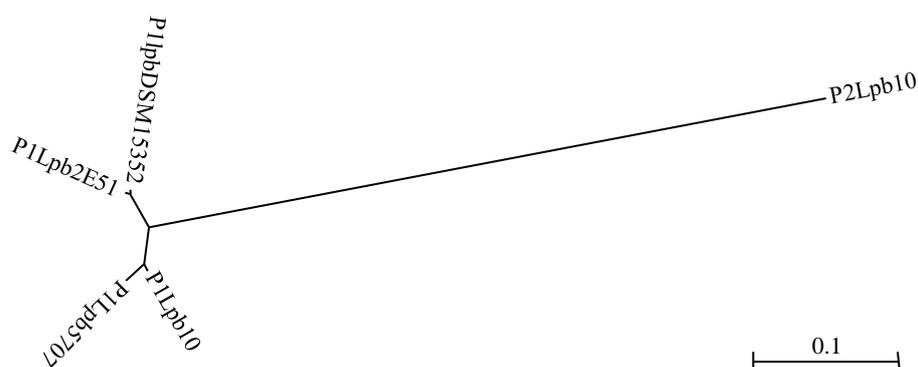


Figura 15: Árbol de alineamiento de las secuencias del gen de la lisina de los profagos P1LpbDSM15352, P1Lpb2E5-1, P1LpbDSM5707, P1Lpb10 y P2Lpb10.

En este árbol se puede observar el agrupamiento de las lisinas codificadas por los profagos P1 (P1LpbDSM15352, P1Lpb2E5-1, P1LpbDSM5707 y P1Lpb10), mientras que la lisina del profago P2Lpb10 de la cepa *L. parabuchneri* 10 se diferencia claramente del resto. Este resultado es acorde con la diferencia observada a nivel genómico entre este profago y el resto de profagos analizados (Figura 12). Debido a la gran similitud observada entre las lisinas de los profagos P1LpbDSM15352, P1Lpb2E5-1, P1LpbDSM5707 y P1Lpb10, se decidió clonar un representante de las mismas, ya que si está presente en todas las cepas es más probable que sea activa frente a todas ellas. Se decidió clonar la correspondiente al profago P1Lpb10 de la cepa *L. parabuchneri* 10 debido a que se disponía tanto de la cepa como de su secuencia genómica lo que permite el diseño de la estrategia de clonación de forma adecuada.

Se diseñaron dos oligonucleótidos, pACELysMNco y pACELysMPst (Tabla 4), para amplificar el gen completo. En los oligonucleótidos se introdujeron sitios de corte para los enzimas *Nco*I y *Pst*I para clonarlo en el plásmido de expresión desde el codón de inicio (ATG), eliminando el codón stop para poder añadir una cola de histidinas en el extremo carboxi-terminal de la proteína que facilite su purificación. Tanto el fragmento de PCR obtenido, como el plásmido pACE se digirieron con los enzimas de restricción

NcoI y PstI y se ligaron con el enzima ligasa. Posteriormente se introdujeron mediante electroporación en la cepa NZ9000 de *L. lactis*. De las placas donde se sembraron las células transformadas con la ligación, se inocularon colonias en 10 ml de GM17 con cloranfenicol a una concentración de 5 µg/ml. Después de incubar *o/n*, se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 500 µl de Tris EDTA con sacarosa (STE), se centrifugó de nuevo, se descartó el sobrenadante, se congeló 1 hora y media y se extrajo el plásmido por el método SDS alcalino descrito en materiales y métodos. A continuación, se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos TestLysF/R (Tabla 4), con el objetivo de identificar qué colonias contenían el plásmido con inserto, visualizando el resultado en gel de agarosa (Figura 16).

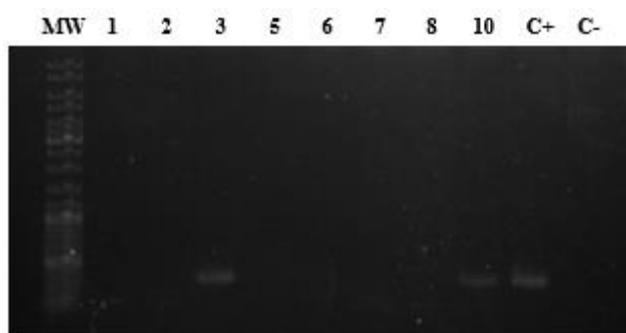


Figura 16: PCR con los oligonucleótidos TestLysF/R de varias de las colonias obtenidas en la transformación con la ligación pACE y el gen *LysM*. MW: Marcador, C+: Control positivo, C-: Control negativo. Resultado positivo para las colonias marcadas con los números 3 y 10.

Las colonias positivas se inocularon en 5 ml de GM17 con cloranfenicol a una concentración de 10 µg/ml. Estos cultivos se incubaron *o/n*. Tras la incubación se centrifugaron los cultivos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se congeló a -20°C para romper las células y facilitar la extracción del plásmido. Al día siguiente se extrajo el ADN plasmídico por el método del SDS alcalino, resuspendiéndose en TE y conservándose a -20°C.

A continuación, se realizó la restricción del plásmido para comprobar la presencia del inserto con los enzimas *NcoI* y *PstI*. En la figura 17 se presenta el resultado de la restricción de una muestra con plásmido vacío y una muestra con plásmido con inserto.

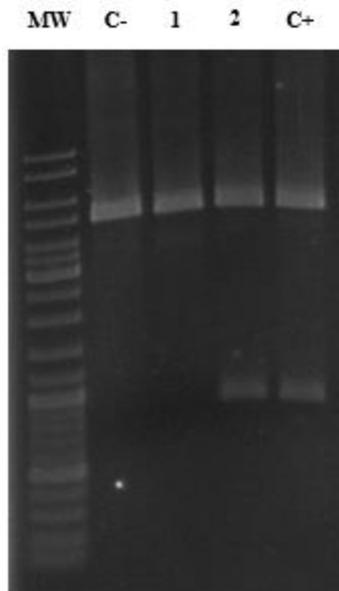


Figura 17: Electroforesis de la restricción del pACE con *NcoI* y *PstI*. MW: Marcador, C-: control negativo, C+: Control positivo, 1: Plásmido vacío, 2: Plásmido con inserto.

Los plásmidos positivos se enviaron a secuenciar utilizando los oligonucleótidos pACE-seq y pNZ-seq, localizados fuera del sitio de clonación. Una vez obtenida la secuencia de los mismos, se comprobó la misma con ayuda del programa Clone Manager. La secuencia de los insertos coincidió con la del gen *LysM*, por lo que se procedió a la sobreexpresión y purificación de la proteína a partir de uno de los clones positivos.

La inducción de la expresión del gen *LysM* se realizó siguiendo las indicaciones de Linares *et al.*, (2015). Como control negativo se utilizó una de las colonias sin inserto. Tras la inducción, se rompieron las células con ayuda de una french press (cell disruptor) y se separaron pellets y sobrenadantes, los cuales se analizaron en un gel de proteínas para comprobar la presencia de la proteína LysM (Figura 18).

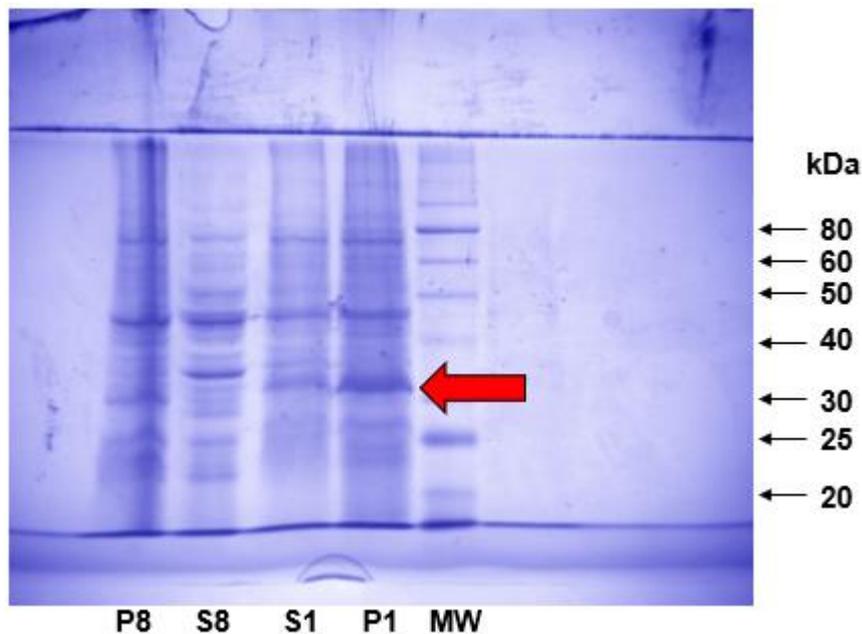


Figura 18: Resultado de la visualización en gel de proteínas de la inducción de la lisina fágica. MW: Marcador P8: Pellet cepa sin inserto, S8: Sobrenadante cepa sin inserto, S1: Sobrenadante cepa con inserto, P1: Pellet cepa con inserto. La flecha indica la banda de sobreexpresión.

Se observa la presencia de una banda de proteína que corresponde con el tamaño molecular esperado (32 kb). Sin embargo, esta banda se observa de forma más intensa en la fracción que corresponde a los pellets celulares (Figura 18), lo que nos indica que la mayor parte de la proteína sobreexpresada sería insoluble y formaría cuerpos de inclusión. En esas condiciones la proteína no sería activa, por lo que no se pudo continuar realizando ningún ensayo de actividad. En un futuro se podrían variar las condiciones de expresión para aumentar la fracción soluble o intentar renaturalizar la proteína de los cuerpos de inclusión y ver la capacidad de esta lisina fágica para inhibir el crecimiento de cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina, lo que constituiría una herramienta para reducir el contenido de este compuesto tóxico en alimentos y de esta forma aumentar la seguridad de los alimentos que consumimos.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1.- Se analizó la presencia de ABs en seis tipos de queso mediante UPLC, encontrándose en cinco de ellos la presencia de aminos biógenas. En cuatro de las muestras se encontraron concentraciones por encima de las consideradas como seguras, lo que justifica la búsqueda de medidas alternativas para reducir la acumulación de ABs en quesos.

2.- Se realizó una búsqueda de bacteriófagos de *L. parabuchneri* en las seis muestras de queso, usando 16 cepas como posibles hospedadoras, sin embargo, no se logró detectar ni aislar ningún bacteriófago.

3.- Se analizó la secuencia genómica de cuatro cepas de *L. parabuchneri* y se identificaron 5 profagos, siendo la primera vez que se describen profagos de esta especie.

4.- Se analizaron las secuencias genómicas de los cinco profagos, identificando sus genes, así como la posible función que codifican cada uno de ellos y se comprobó que se agrupan en módulos funcionales relacionados con las diferentes etapas del ciclo de vida.

5.- Se compararon los genomas de los cinco profagos, observándose un grupo constituido por los fagos P1-2E51, P1-DSM15352, P1-Lpb10 y P1-DSM5707 (grupo 1) y por otro lado el profago P2-Lpb10.

6.- Se comprobó mediante un test específico de PCR desarrollado en este trabajo la presencia de profagos pertenecientes al grupo 1 en las 16 cepas de *L. parabuchneri* usadas en este trabajo.

7.- El uso de mitomicina C y ciprofloxacina no produjo la inducción de los profagos en ninguna de las cepas ensayadas.

8.- Se identificó en cada uno de los profagos el gen que codifica la lisina y su comparación reveló nuevamente la existencia de dos grupos diferenciados, el de los profagos del grupo 1 y el del profago P2-Lpb10.

9.- Se clonó el gen *LysM* que codifica la lisina del profago P1-Lpb10 en el vector pACE de *L. lactis* y se sobrexpresó, obteniéndose un buen nivel de producción de la lisina. Sin embargo, la mayor parte de la proteína se encontraba de forma insoluble en el pellet del cultivo.

*Índice de
Abreviaturas*

6. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA: Aminoácido.

AB: Amina biógena.

ADC: Arginina descarboxilasa.

ADI: Ruta de la arginina deiminasa.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AGDI: Ruta de la agmatina deiminasa.

AO: Amino oxidasa.

ARN: Ácido ribonucleico.

BAL: Bacterias del ácido láctico.

CAD: Cadaverina.

C+G: Citosina + Guanina.

DAO: Diamino oxidasa.

DEEM: Dietiletoximetilen malonato.

dNTP: Desoxirribonucleótidos
trifosfato.

EBI: Instituto Bioinformático Europeo.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EFSA: Autoridad Europea de
Seguridad Alimentaria.

FDA: Administración de Alimentos y
Medicamentos.

FDC: β -fenilalanina descarboxilasa.

GM17: Medio M17 suplementado con
Glucosa al 0,5%.

GRAS: Generalmente reconocidos
como seguros.

HDC: Histamina descarboxilasa.

HMA: Histamina.

IDAO: Inhibidor de la diamino oxidasa.

IMAO: Inhibidor de la monoamino
oxidasa.

LDC: Lisina descarboxilasa.

MAO: Monoamino oxidasa.

MCM: Medio MRS suplementado con
10mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y 10 mM de
 Mg_2SO_4 .

NAM: Ácido N-acetil-murámico.

NAG: N-acetil-glucosamina.

NE: No ensayado.

ND: No detectado.

ODC: Ornitina descarboxilasa.

o/n: Overnight/ Incubación durante
toda la noche.

PCR: Reacción en cadena de la
polimerasa.

PHE: β -feniletilamina.

PUT: Putrescina.

p/v: Peso/Volumen.

QPS: Presunción de seguridad
cualificada.

RNAsa: Ribonucleasa.

rpm: Revoluciones por minuto.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SGM17: Medio M17 suplementado con Glucosa al 0,5% y Sacarosa 0,5M.

SGGM17: Medio M17 suplementado con Glucosa al 0,5%, Sacarosa 0,5M y Glicina al 3%.

SM: Tampón de conservación de fagos.

STE: TrisEDTA con Sacarosa.

TAE: Tampón Tris-acetato-EDTA.

TDC: Tirosina descarboxilasa.

TDPA: 3,30- Ácido tiodipropiónico.

TMA: Tiramina.

TRP: Triptamina.

UPLC: Cromatografía líquida de ultra-alta resolución

UV: Ultravioleta.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann, HW. & DuBow, MS.** (1987). Bacteriophage taxonomy. Viruses of Prokaryotes. *CRC Press, Boca Raton*. **1**: 13-28.
- Ackermann, HW.** (2001) Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Archives of Virology*. **146**: 843-857.
- Ackermann, HW.** (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*. **154**: 245-251.
- Altschul, SF., Madden, TL., Schaffer, AA., Zhang, JH., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, DJ.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. **25**: 3389-3402.
- Alvarez, MA. & Moreno-Arribas, MV.** (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science and Technology*, **39**(2): 146-155.
- Aziz, RK., Bartels, D., Best, AA., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, RA., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, EM., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, GJ., Olson, R., Osterman, AL., Overbeek, RA., McNeil, LK., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, GD., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. & Zagnitko, O.** (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, **9**: 75.
- Bardócz, S.** (1999). Role of biogenic amines-summing up or what is it we do not know? *Biogenically Active Amines in Food*. **3**: 1-4.
- Calles-Enríquez, M., Eriksen, BH., Andersen, PS., Rattray, FP., Johansen, AH., Fernández, M., Ladero, V. & Álvarez, MA.** (2010). Sequencing and transcriptional analysis of the *Streptococcus thermophilus* histamine biosynthesis gene cluster: factors that affect differential *hdcA* expression. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**(18): 6231-6238.
- Caso, JL., de los Reyes-Gavilán, CG., Herrero, M., Montilla, A., Rodríguez, A. & Suárez, JE.** (1995). Isolation and characterization of temperate and virulent bacteriophages of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Science*, **78**: 741-750.

- Chopin, A., Bolotin, A., Sorokin, A., Ehrlich, SD. & Chopin, M.** (2001). Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucleic Acids Research*, **29**(3): 644-651.
- De Vos, WM.** (1989). On the carrier state of bacteriophages in starter *Lactococci*: an elementary explanation involving a bacteriophage resistance plasmid. *Netherland Milk Dairy Journal*, **43**: 221-227.
- Del Rio, B., Redruello, B., Ladero, V., Fernández, M., Martín, MC., & Álvarez, MA.** (2016). Putrescine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CECT 8666 is reduced by NaCl via a decrease in bacterial growth and the repression of the genes involved in putrescine production. *International Journal of Food Microbiology*, **232**:1-6.
- Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C. & Janssens, D.** (1994). Características generales des bactéries lactiques. *Bactéries Lactiques*. **1**: 25–116.
- Díaz, M., Ladero, V., Redruello, B., Sanchez-Llana, E., Del Rio, B., Fernandez, M., Martín, MC. & Álvarez, MA.** (2016a). A PCR-DGGE method for the identification of histamine-producing bacteria in cheese. *Food Control*. **63**: 216-223.
- Díaz, M., del Rio, B., Sánchez-Llana, E., Ladero, V., Redruello, B., Fernández, M., Martín, MC. & Álvarez, MA.** (2016b). Histamine-producing *Lactobacillus parabuchneri* strains isolated from grated cheese can form biofilms on stainless steel. *Food Microbiology*. **59**: 85-91.
- Díaz, M., Ladero, V., del Rio, B., Redruello, B., Fernandez, M., Martín, MC. & Álvarez, MA.** (2016c). Biofilm-forming capacity in biogenic amine-producing bacteria isolated from dairy products. *Frontiers in Microbiology*. **7**:591.
- European Food Safety Authority (EFSA)** (2011). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal*. **9**(10): 2393-2486.
- European Commission (EC)** (2005). Commission Regulation (EC) N° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. **L338**: 1–26.

- Fernández, M., Linares, DM., Del Río, B., Ladero, V. & Álvarez, MA.** (2007). HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *Journal of Dairy Research*, **74**(3): 276-82.
- Food and Drug Administration (FDA)** (2001). Scombro toxin (histamine) formation. In Fish and fishery products hazards and controls guide. Washington, DC: P. H. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood.
- Forsman, R.** (1993). Characterization of a prolate-headed bacteriophage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and its DNA homology with isometric-headed phages. *Archives of Virology*, **132**: 321-330.
- García, P., Ladero, V. & Suárez, JE.** (2003). Analysis of the morphogenetic cluster and genome of the temperate *Lactobacillus casei* bacteriophage A2. *Archives of Virology*, **148**: 1051-1070.
- García, P., Martínez, B., Obeso, JM., Rodríguez, A.** (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*, **47**: 479-485.
- García, P., Martínez, B., Rodríguez, L., Gutiérrez, D. & Rodríguez, A.** (2012). Bacteriophages as biocontrol agents in dairy processing. En: Quiberoni, A.L., Reinheimer, A. (Eds.), *Bacteriophages in Dairy Processing*. Nova Science Publishers, USA, pp. 269-294.
- Gasser, F., Montel, MC, Talon, R. & Champomier, M.** (1994). **Aplication de la taxonomie moléculaire á la classification des bactéries lactiques.** En **Bactéries lactiques. Roissart H. & Luquet F.M. (Eds). Vol I: 117-139.**
- Giaouris, E., Heir, E., Hebraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretrø, T., Habimana, O., Desvaux, M., Renier, S. & Nychas, GJ.** (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science* **97**(3): 298-309.
- Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel., O.** (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*. **27**(2): 221-224.
- Gutiérrez, D., Vandenneuvel, D., Martínez, B., Rodríguez, A., Lavigne, R., & García, P.** (2015). Two phages, philPLA-RODI and philPLA-C1C, lyse

mono-and dual-species staphylococcal biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. **81**: 3336-3348.

Harper, D. & Kutter, E. (2008). Bacteriophage: therapeutic uses. *The Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley&Sons, Chichester, UK*.

Herrero-Fresno, A., Martínez, N., Sánchez-Llana, E., Díaz, M., Fernández, M., Martín, M.C., Ladero, V., & Alvarez, M.A. (2012). *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*. **157**(2): 297-304.

Hill, S.J., Ganellin, CR., Timmerman, H., Schwartz, J.C., Shankley, NP., Young, J.M., Schunack, W., Levi, R. & Haas, H.L. (1997). International Union of Pharmacology. XIII. Classification of Histamine Receptors. *Pharmacological reviews*. **49**: 253-278.

Hofstra, CL., Desai, P.J., Thurmond, R.L. & Fung-Leung, WP. (2003). Histamine H4 Receptor Mediates Chemotaxis and Calcium Mobilization of Mast Cells. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **305**(3): 1212–1221.

Hu, S., Kong, J., Kong, W., Guo, T. & Ji, M. (2010). Characterization of a novel LysM domain from *Lactobacillus fermentum* bacteriophage endolysin and its use as an anchor to display heterologous proteins on the surfaces of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**: 2410–2418.

Igarashi, K, Ito, K & Kashiwagi, K. (2001). Polyamine uptake system in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology* **152**: 271-278.

Jarvis, AW., Fitzgerald, GF., Mata, M., Mercenier, A., Neve, H., Powell, IB., Ronda, C., Saxelin, M. & Teuber, M. (1991). Species and type phages of lactococcal bacteriophages. *Intervirology*. **32**: 2-9.

Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*. **49**: 209-224.

Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**(5259): 680-685.

Ladero, V., García, P., Bascarán, V., Herrero, M., Álvarez, MA. & Suárez, JE. (1998). Identification of the repressor-encoding gene of the *Lactobacillus* bacteriophage A2. *Journal of Bacteriology* **180**(13): 3474-3476.

- Ladero, V., Fernandez, M. & Álvarez, MA.** (2009). Effect of post-ripening processing on the histamine and histamine-producing bacteria contents of different cheeses. *International Dairy Journal*. **19**: 759-762.
- Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernández, M. & Álvarez, MA.** (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*. **6**: 145-156.
- Ladero, V., Linares, DM., Perez, M., Del Rio, B., Fernández, M. & Álvarez, MA.** (2016). Biogenic Amines in Dairy Products. *Microbial toxins*. Technical Series of the Society of Dairy Technology in the UK. En prensa.
- Linares, DM., Martín, MC., Álvarez, MA. & Fernández, M.** (2011). Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **51**: 691-703.
- Linares, DM., del Rio, B., Ladero, V., Martinez, N., Fernandez, M., Martin, MC. & Álvarez, MA.** (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*. **3**: 180.
- Linares, DM., Álvarez-Sieiro, P., Del Rio, B., Ladero, V., Redruello, B., Martin, MC., Fernández, M. & Álvarez, MA.** (2015). Implementation of the agmatine-controlled expression system for inducible gene expression in *Lactococcus lactis*. *Microbial Cell Factories*. **14**: 208.
- Linares, DM., Del Rio, B., Redruello, B., Ladero, V., Martin, MC., Fernandez, M., Ruas-Madiedo, P. & Álvarez MA.** (2016). Comparative analysis of the in vitro cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine. *Food Chemistry*. **197**(Pt A):658-663.
- Ling, P., Ngo K, Nguyen, S., Thurmond, RL., Edwards, JP., Karlsson, L. & Fung-Leung, WP.** (2004). Histamine H₄ receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *British Journal of Pharmacology*. **142**(1): 161-171.
- Maintz, L. & Novak, N.** (2007). Histamine and histamine intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*. **85**(5):1185-1196.
- Sambrook, J., Fritsch, EF., & Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition). *Cold Spring Harbor Laboratory*.

- Martín, MC, Fernández, M, Linares, DM, & Alvarez, MA.** (2005). Sequencing, characterization and transcriptional análisis of the histidina decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*. *Microbiology*. **151**: 1219-1228.
- Martínez, B., Roces, C., Gutiérrez, D., García, P. & Rodríguez, A.** (2014). Bioconservantes con futuro: Bacteriocinas, bacteriófagos y endolisinas. En: Roa, I., Pacheco, R., Tabla, R., Rebollo, J.E. (Eds.), Biocontrol en la industria láctea. *Bubok Publishing S.L.*, Madrid, España, pp. 153-173.
- McKay, L.L. & Baldwin, K.** (1990). Applications for Biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **87**: 3-14.
- Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A. & Griffiths, MW.** (2001). Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Protection*. **64**: 927-933.
- Nes, I.G., Brendehaug, J. & von Husby, K.O.** (1988). Characterization of the bacteriophage B2 of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Biochemistry*. **70**: 423-427.
- Pérez, M., Calles-Enríquez, M., Nes, I., Martín, MC., Fernández, M., Ladero, V., & Álvarez, MA.** (2015). Tyramine biosynthesis is transcriptionally induced at low pH and improves the fitness of *Enterococcus faecalis* in acidic environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **99**(8): 3547-3558.
- Redruello, B., Ladero, V., Cuesta, I., Álvarez-Buylla, J.R., Martín, MC., Fernández, M. & Álvarez, MA.** (2013). A fast, reliable, ultra-high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent. *Food Chemistry*. **139**(1-4): 1029-1035.
- Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Donovan, DM., Rodríguez, A. & García, P.** (2013). Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzybiotics. *Critical Reviews in Microbiology*. **39**: 427-434.
- Ruiz-Barba, JL., Maldonado, A. & Jiménez-Díaz, R.** (2005). Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry*. **347**(2): 333-335.

- Schelp, E, Worley, S, Monzingo, AF, Ernst, S & Robertus JD.** (2001) pH-induced structural changes regulate histidine decarboxylase activity in *Lactobacillus* 30a. *Journal of Molecular Biology* **306**: 727-732.
- Schleifer, KH., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig W. & Amann, R.** (1995). Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Journal of Dairy Research*. **5**: 1081-1094.
- Schmelcher, M. & Loessner, MJ.** (2014). Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage*. **4**: e28137.
- Séchaud, L., Rousseau, M., Fayard, B., Callegari, ML., Quénee, P. & Accolas, JP.** (1992). Comparative study of 35 bacteriophages of *Lactobacillus helveticus*: morphology and host range. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1011-1018.
- Shalaby, AR.** (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. **29**, 675–690.
- Silla Santos, MH.** (1996). Biogenic amines: Their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. **29**: 213-231.
- Stratton, JE., Hutkins, RW., & Taylor, SL.** (1991). Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*. **54**: 460–470.
- Sulakvelidze, A. & Morris Jr., JG.** (2001). Bacteriophages as therapeutic agents. *Annals of Medicine*. **33**: 507-509.
- Sumner, S.S., Speckhard, H.W., Somers, E.B., & Taylor, S.L.** (1985). Isolation of histamine-producing *Lactobacillus buchneri* from Swiss cheese implicated in a food poisoning outbreak. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 1094–1096.
- Summers, WC.** (2005). Bacteriophage research: Early history. Kutter, E., Sulakvelidze, A. (Eds.), *Bacteriophages: Biology and applications*. CRC Press, Boca Raton, FL. 5-27.
- Suzzi, G. & Gardini, F.** (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*. **88**: 41-54.
- Tabor, CW. & Tabor, H.** (1985). Polyamines in microorganisms. *Microbiological Reviews*. **49**: 81-99.

- Trevors, KE., Holley, RA. & Kempton, AG.** (1983). Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage isolated from a meat starter culture. *Journal of Applied Bacteriology* **54**: 281-288.
- Trip, H., Mulder, NL, Rattray, FP. & Lolkema, JS.** (2011). HdcB, a novel enzyme catalysing maturation of pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase. *Molecular Microbiology*. **79**(4): 861–871.
- Uchiyama, J., Rashed, M., Takemura, I., Wakiguchi, H., & Matsuzaki, S.** (2008). In silico and in vivo evaluation of bacteriophage phiEF24C, a candidate for treatment of *Enterococcus faecalis* infections. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**(13):4149-4163.
- Wang, IN., Smith, DL., Young, R.** (2000). Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annual Reviews of Microbiology*. **54**: 799-825.
- Yoon, SS., Barrangou-Pouey, R., Breidt Jr., F., Klaenhammer, TR. & Fleming, HP.** (2002). Isolation and characterization of bacteriophages from fermenting sauerkraut. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 973-976.
- Zhou, X., Qiu, M., Zhao, D., Lu, F. & Ding Y.** (2016). Inhibitory Effects of Spices on Biogenic Amine Accumulation during Fish Sauce Fermentation. *Journal of Food Science*. **81**(4): M913-M920.
- Zuber, S., Boissin-Delaporte, C., Michot, L., Iversen, C., Diep, B., Brüssow, H. & Breeuwer, P.** (2008). Decreasing *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) food contamination level with bacteriophages: prospects and problems. *Microbial Biotechnology*. **1**: 532-543.

Anexos

8. ANEXOS

Inicio	Fin	Cadena	Función
203	1336	-	Integrase family protein
1574	3313	+	S-layer protein
3884	4429	-	Bifunctional transcriptional regulator, S24 family
4781	4996	+	DNA-binding protein / Transcriptional regulator
5278	5445	-	Hypothetical protein
5558	5758	+	Hypothetical protein
5970	6410	-	Hypothetical protein
6468	6794	+	Hypothetical protein
6800	7075	-	Hypothetical protein
8177	9034	+	Hypothetical protein
9037	9732	+	Phage nucleotide-binding protein
9716	10411	+	Pathogenesis-related transcriptional factor
10401	11756	+	Type III restriction protein subunit
11773	12366	+	Single-stranded DNA-binding protein
12378	14678	+	Phage plasmid primase, P4 family domain protein
15289	15702	+	Hypothetical protein
15746	16228	+	Hypothetical protein
16599	17495	+	Hypothetical protein
17608	17928	+	HNH endonuclease
18608	19036	+	Phage terminase, small subunit
19036	20931	+	Phage terminase, large subunit
21194	22318	+	Phage portal protein, HK97 family
22299	23000	+	S14 family endopeptidase ClpP
23004	24245	+	Phage phi-C31 gp36 major capsid family protein
24309	24599	+	Bacteriophage QLRG family DNA packaging
24953	25342	+	Phage protein, HK97 gp10 family
25321	25731	+	Phage tail protein
25732	26418	+	Phage major tail protein
26537	26854	+	Molecular chaperone
27084	32639	+	Tail protein
32632	33864	+	Phage tail component protein
34059	34619	+	Hypothetical protein
34668	37250	+	Phage minor structural protein
37247	38077	+	Hypothetical protein
38220	39947	+	Prophage protein
40573	41040	+	Holin
41044	41877	+	Glycosyl hydrolase family 25
41877	42128	+	Holin

Tabla A.1: Codones de inicio, final, orientación y función de los genes del profago P1DSM15352 de *L. parabuchneri* DSM 15352.

Inicio	Fin	Cadena	Función
341	1474	-	Integrase family protein
1713	3458	+	S- layer protein
4501	4731	-	Transposase IS4 family protein
4829	5416	-	Phage repressor like XRE transcriptional regulator
6155	6367	-	Hypothetical protein
6668	6865	+	Hypothetical protein
6840	7364	-	Hypothetical protein
7648	7974	+	Hypothetical protein
7980	8255	-	Hypothetical protein
9346	9831	+	Hypothetical protein
9855	11228	+	Type III restriction protein subunit
11300	11980	+	NTP-binding protein
11998	12507	+	Hypothetical protein
12633	13361	+	Prophage Lp3 protein 7
13361	14632	+	Prophage Lp3 protein 8, helicase
15212	15625	+	Hypothetical protein
15724	15990	+	Hypothetical protein
16549	17445	+	Hypothetical protein
17558	17878	+	HNH endonuclease
18436	19659	+	Transposase
19669	20406	+	Transposase
20734	21162	+	Phage terminase small subunit
21162	23057	+	Phage terminase large subunit
23320	24444	+	Phage portal protein, HK97 family
24425	25126	+	S14 family endopeptidase ClpP
25130	26371	+	Phage phi-C31 gp36 major capsid family protein
26435	26725	+	Bacteriophage QLRG family DNA packaging
26715	27077	+	Head-tail joining protein
27079	27468	+	Head-tail joining protein
27447	27857	+	Phage tail protein
27858	28616	+	Phage major tail protein
28675	29052	+	Molecular chaperone
29097	29261	+	Phage tail assembly
29282	34837	+	Tail protein
34830	36080	+	Phage tail component protein
36086	36835	+	Phage tail component protein
36884	39466	+	Phage minor structural protein
39463	40293	+	Carbohydrate binding protein
40436	42190	+	Hypothetical protein
42813	43280	+	Holin
43284	44117	+	Lysin
44117	44368	+	Holin

Tabla A.2: Codones de inicio, final, orientación y función de los genes del profago P15707 de *L. parabuchneri* DSM 5707.

Inicio	Fin	Cadena	Función
409	642	+	Phage repressor
1073	1810	-	Transposase
1820	3043	-	Integrase
3143	3313	-	Hypothetical protein
3383	3583	+	Hypothetical protein
3623	3787	+	Prophage protein
3747	3944	-	Prophage protein
4002	4328	+	Hypothetical protein
4334	4609	-	Hypothetical protein
4780	4974	+	Hypothetical protein
5264	5422	+	Hypothetical protein
5711	6568	+	Conserved hypothetical phage associated protein
6571	7266	+	Phage DNA-binding protein
7250	7945	+	Phage protein
7935	9290	+	DNA helicase, phage-associated
9307	9900	+	Phage protein
9912	12215	+	DNA primase/helicase, phage-associated
12529	12807	+	Phage protein
12809	13222	+	Hypothetical protein
13313	13762	+	Adenine methyltransferase
13846	14037	+	Hypothetical protein
14096	14992	+	Hypothetical protein
15105	15425	+	Prophage pi1 protein 32
16050	16568	+	Phage terminase small subunit
16568	18463	+	Phage terminase, large subunit
18524	18688	+	Hypothetical protein
18702	19850	+	Phage portal protein
19831	20532	+	Prophage Clp protease-like protein
20536	21777	+	Phage capsid protein
21841	22131	+	Bacteriophage QLRG family DNA packaging
22121	22483	+	Phage head-tail joining protein
22485	22874	+	Phage tail assembly
22874	23263	+	Putative tail component
23264	23950	+	Phage major tail protein
24009	24386	+	Phage tail assembly
24431	24595	+	Hypothetical protein
24595	30171	+	Phage tail length tape-measure protein
30164	31414	+	Phage-related protein
31420	32169	+	Phage-related protein
32218	34800	+	Phage minor structural protein
34797	35630	+	Hypothetical protein
35640	35780	+	Hypothetical protein
35773	37806	+	Prophage Lp2 protein 53
37960	38370	+	Hypothetical protein
38388	38564	+	XkdX family protein
38958	39425	+	Putative phage holin, LL-H family
39438	40262	+	Lysozyme M1
40262	40513	+	Holin

Tabla A.3: Codones de inicio, final, orientación y función de los genes del profago P12E51 de *L. parabuchneri* 2E51.

Inicio	Fin	Cadena	Función
437	1570	-	Integrase
1808	3577	+	S-layer protein
3581	3727	-	Hypothetical protein
4141	4878	-	Phage repressor
5048	5281	+	Phage repressor
5772	6128	-	Hypothetical protein
6195	6314	+	Hypothetical protein
6508	6708	+	Hypothetical protein
6748	6912	+	Prophage protein
7127	7453	+	Hypothetical protein
7459	7734	-	Hypothetical protein
7904	8098	+	Hypothetical protein
8377	8535	+	Hypothetical protein
8535	8804	+	Hypothetical protein
8824	9675	+	Phage protein
9688	11061	+	DNA helicase, phage-associated
11058	11813	+	NTP-binding protein
11816	12340	+	Prophage protein
12406	13194	+	Phage replication protein
13194	14381	+	Helicase
14410	15093	-	Transposase IS30 family
15755	16072	+	Conserved hypothetical phage protein
16074	16487	+	Hypothetical protein
16493	16894	+	Hypothetical protein
16891	17109	+	Hypothetical protein
17109	17240	+	Hypothetical protein
17251	17646	+	DNA packaging protein
17740	17931	+	Hypothetical protein
17990	18886	+	Hypothetical protein
18999	19319	+	Prophage pi1 protein 32
19945	20463	+	Phage terminase small subunit
20463	22358	+	Phage terminase large subunit
22419	22583	+	Hypothetical protein
22597	23745	+	Phage portal protein
23726	24427	+	Prophage Clp protease-like protein
24431	25672	+	Phage capsid protein
25736	26026	+	Hypothetical protein
26016	26378	+	Phage head-tail joining protein
26371	26769	+	Phage tail assembly
26769	27158	+	Putative tail component
27159	27845	+	Phage major tail protein
27904	28281	+	Phage tail assembly
28326	28490	+	Hypothetical protein
28490	34066	+	Phage tail length tape-measure protein
34059	35291	+	Phage-related protein
35297	36046	+	Phage-related protein
36095	38677	+	Hypothetical protein
38674	39504	+	Hypothetical protein
39514	39654	+	Hypothetical protein
39647	41440	+	Hypothetical protein
41462	41590	+	Hypothetical protein
42066	42533	+	Holin
42546	43370	+	Lysin
43370	43621	+	Holin

Tabla A.4: Codones de inicio, final, orientación y función de los genes del profago P1Lpb10 de *L. parabuchneri* 10.

Inicio	Fin	Cadena	Función
168	1340	-	Integrase
1596	1976	-	Transporter
2031	2585	-	Hypothetical protein
2650	3360	-	SOS-response repressor
3497	3745	+	Transcriptional regulator
3775	4527	+	Phage antirepressor protein
4524	4712	+	Hypothetical protein
4782	4895	+	Toxin-antitoxin system, Bro family
5076	5582	+	Prophage Lp2 protein 13
5588	5875	+	Prophage Lp1 protein 15
5888	6028	+	Hypothetical protein
6163	6306	+	Hypothetical protein
6303	6488	+	Hypothetical protein
6491	7006	+	Single-stranded DNA-protection protein
6993	7712	+	Single-stranded DNA-binding protein
7726	8613	+	Replication protein
8603	9883	+	Replicative DNA helicase
9861	10253	+	Hypothetical protein
10267	10683	+	Single-stranded DNA-binding protein
10811	11503	+	Phage protein
11493	11657	+	Hypothetical protein
11762	11899	+	Hypothetical protein
12054	12479	+	Phage protein
12494	12997	+	Hypothetical protein
12994	13668	+	Phage protein
13665	14099	+	Phage protein
14096	14284	+	Hypothetical protein
14335	14868	+	Hypothetical protein
14935	15339	+	Hypothetical protein
15336	15452	+	Hypothetical protein
15453	15620	+	Hypothetical protein
15636	15803	+	Hypothetical protein
16086	16325	+	Hypothetical protein
16312	16491	+	Hypothetical protein
16493	16711	+	Hypothetical protein
16814	17278	+	Phage-encoded transcriptional regulator
18024	18302	+	Phage protein
18531	18707	+	Hypothetical protein
18772	19248	+	Phage terminase small subunit
19238	20557	+	Phage terminase large subunit
20569	20895	+	Hypothetical protein
20873	22666	+	Phage portal protein
22818	23528	+	Phage Mu protein F like protein
23642	24301	+	Phage capsid and scaffold
24314	25366	+	Phage capsid protein
25380	25721	+	Hypothetical protein
25718	26347	+	Putative morphogenesis protein
26313	26720	+	Hypothetical protein
26723	27094	+	Hypothetical protein
27087	27575	+	Outer membrane insertion signal domain protein
27575	28669	+	Phage-related protein
28686	29183	+	Hypothetical protein
29243	29869	+	Hypothetical protein
29844	30128	+	Hypothetical protein
30131	34195	+	Phage tail length tape-measure protein

34192	35397	+	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
35397	35732	+	Hypothetical protein
35732	36664	+	Hypothetical protein
36657	37091	+	Hypothetical protein
37088	37489	+	Hypothetical protein
37473	38708	+	Putative bacteriophage protein
38722	39324	+	Hypothetical protein
39325	41511	+	Hypothetical protein
41670	41993	+	Phage protein
42007	42222	+	Hypothetical protein
42222	42740	+	Hypothetical protein
42740	43564	+	Lysozyme M1 (1,4-beta-N-acetylmuramidase)
43742	43963	+	Hypothetical protein

Tabla A.5: Codones de inicio, final, orientación y función de los genes del profago P2Lpb10 de *L. parabuchneri* 10.