

## ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE FAGOS TEMPERADOS DE *Lactobacillus delbrueckii* A FACTORES FÍSICOS DE CONSERVACIÓN E HIGIENE

A.C. Ebrecht, D.M. Guglielmotti, J.A. Reinheimer, M.L. Capra y V.B. Suárez

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) – UNL / CONICET – 1° de Mayo 3250 – Santa Fe –  
Argentina. E mail: [vivisuar@fiq.unl.edu.ar](mailto:vivisuar@fiq.unl.edu.ar)

**Resumen:** En este trabajo se estudió la viabilidad de dos fagos temperados de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (Cb1/204 y Cb1/342) al pH, a distintas temperaturas de conservación y a distintos tratamientos térmicos aplicados a la leche durante su procesamiento en la industria. Ambos fagos mantuvieron su nivel de recuento entre pH 4 y 9, hasta 30 min de exposición. El fago Cb1/342 resultó más resistente que el fago Cb1/204 ya que mantuvo igual recuento aún a pH 3. Ambos fagos se inactivaron a valores de pH extremos de 2 y 10. La viabilidad de ambos fagos a las temperaturas de conservación fue similar. A 4 °C disminuyeron su recuento en 2 órdenes logarítmicos, mientras que a temperaturas de congelación de -80 °C el fago Cb1/204 resultó un poco menos resistente, ya que disminuyó en un orden logarítmico su recuento, mientras el fago Cb1/342 permaneció constante. Se observó que un tratamiento de 63 °C, realizado en leche, no eliminó la totalidad de las partículas fágicas iniciales de ninguno de los fagos estudiados. Si bien la mayor parte de la población (más del 99%) se inactivó en los primeros minutos de tratamiento, una fracción resultó termorresistente y permaneció activa durante los 30 min de ensayo. A 72°C, el fago Cb1/204 resultó claramente más resistente. El tiempo necesario para eliminar el 99 % de las partículas fágicas presentes ( $T_{99}$ ) fue mayor que para el otro fago y recién a los 20 min se inactivó la población completa del mismo, mientras que sólo 5 min resultaron suficientes para eliminar completamente la población del fago Cb1/342. El tratamiento de 82 °C aplicado a la leche antes de ser destinada a la elaboración de yogur aseguró la eliminación de ambos fagos a los 2 min. Los resultados obtenidos ayudan a conocer las características de los fagos de *Lactobacillus delbrueckii* para mejorar su manejo en lo referente a la conservación y al control en planta o laboratorio.

**Palabras clave:** bacteriofagos, bacterias lácticas, fagos temperados.

### INTRODUCCIÓN

Las infecciones fágicas de bacterias lácticas (BAL) usadas como cultivos iniciadores en la industria láctea fermentativa es una de las causas principales de fallas en su capacidad acidificante (Neve, 1996; Moineau, 1999). Este hecho puede provocar severas consecuencias tecnológicas y comerciales (Jarvis, 1989; Brüssow y col., 1994; Bruttin y col., 1997). El estudio de la resistencia de los bacteriofagos a diferentes factores físicos es indispensable, ya sea para lograr una mejor conservación de los mismos como para asegurar su destrucción y optimizar su control en la industria.

### MATERIALES Y MÉTODOS

*Cepas y fagos utilizados*

Para este trabajo se utilizaron dos fagos inducidos a partir de la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* Cb1, denominados Cb1/204 y Cb1/342. Como hospedadoras se utilizaron las cepas comerciales *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 204 (*L.l* 204) y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 342 (*L.b* 342), respectivamente.

Las bacterias sensibles fueron mantenidas como stocks congelados a -80 °C en caldo MRS (BIOKAR, Beavois, Francia) adicionado de glicerol (15 % v/v). Para realizar los cultivos y reactivación de las cepas, éstas fueron incubadas a 42 °C en caldo MRS. Cultivos overnight de las cepas fueron mantenidos como stock a 4 °C durante los ensayos. Los stocks de fagos se prepararon según Neviani y col. (1992). Su propagación se llevó a cabo en caldo MRS

adicionado de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  10 mM, incubando a 37 °C hasta observación de lisis completa, en comparación con un control (cepa sensible sin adición del fago).

#### *Viabilidad durante la conservación*

Para cada bacteriofago, se trabajó a partir de un stock de filtrado de alto título (aprox.  $10^8$  UFP/ml), conservado en heladera (4 °C). También se dispuso de reservas almacenadas a -20 °C y -80 °C, de las suspensiones fágicas adicionadas de glicerol 15% (v/v).

Se realizó un seguimiento de la viabilidad de los fagos temperados conservados a estas tres temperaturas, a través de la determinación de sus títulos durante un periodo de 2 meses.

#### *Viabilidad a distintos valores de pH*

Para realizar este ensayo se utilizó caldo MRS, ajustando los valores de pH entre 2 y 10 (pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10). Alícuotas de las suspensiones fágicas a investigar fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos en el medio modificado a los distintos valores de pH. En paralelo, se realizó un control utilizando MRS cuyo valor de pH no fue modificado (pH =  $6,4 \pm 0,1$ ). Transcurrido el tiempo de tratamiento establecido, las suspensiones fueron tituladas.

#### *Cinéticas de muerte térmica*

Se llevaron a cabo estudios de inactivación térmica en dos medios de suspensión diferentes: caldo MRS y Leche Descremada Reconstituida al 10% (p/v) (LDR). Las temperaturas elegidas para los ensayos correspondieron a las utilizadas normalmente en la industria para el tratamiento de la leche cruda en distintos procesos: 63 °C (pasteurización de baja temperatura, LTLT), 72°C (pasteurización de alta temperatura, HTST), 82 °C (leche destinada a yogur) y 90°C (temperatura de referencia recomendada por la FIL-IDF para destrucción de fagos y también utilizada para la leche destinada a yogur). Los controles fueron mantenidos a temperatura ambiente (25 °C). Los ensayos llevados a cabo en este trabajo fueron realizados a 63 °C, 72 °C y 90 °C, con los fagos Cb1/204 y Cb1/342 y a 82 °C con los fagos temperados y 3 fagos líticos de *Lb. delbrueckii* (YAB, BYM y Ib<sub>3</sub>).

Las suspensiones de partículas fágicas se inocularon en los medios seleccionados de manera de obtener una concentración inicial de aproximadamente  $10^6$  UFP/ml, distribuyéndose alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf. Éstos fueron mantenidos a las temperaturas preestablecidas, y a intervalos de tiempo predeterminados (2, 5, 10, 20, 30 minutos) los tubos fueron retirados del baño e inmediatamente refrigerados (baño de hielo),

para luego determinar la concentración de las partículas viables. Se construyeron las cinéticas de inactivación térmica para cada una de las temperaturas ensayadas en los dos medios de suspensión. A partir de dichas curvas de supervivencia se determinó, para cada condición, el tiempo necesario para inactivar el 99% de las partículas fágicas ( $T_{99}$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### *Viabilidad de los bacteriofagos temperados durante la conservación*

En general, la viabilidad de ambos fagos temperados a las temperaturas de conservación fue similar. Durante el seguimiento de los fagos almacenados a 4 °C, se observó una disminución de su recuento en dos órdenes log. A -20 °C, también se observó una menor viabilidad, en este caso mayor a un orden log. Por otro lado, a -80 °C el número de partículas activas de Cb1/342 permaneció constante durante el tiempo de ensayo, pero el título del fago Cb1/204 fue un orden logarítmico más bajo luego de dos meses de almacenamiento.

Los fagos líticos de *Lactobacillus delbrueckii* (BYM, YAB y Ib<sub>3</sub>) mostraron, en general, una mayor viabilidad que los temperados durante su conservación. A 4°C, los títulos de los fagos líticos disminuyeron entre dos (YAB y BYM) y tres (Ib<sub>3</sub>) órdenes logarítmicos en 14 y 18 meses, respectivamente. Tanto a -20 °C como a -80 °C, se observó una caída menor a dos órdenes del recuento de Ib<sub>3</sub> en un período de 18 meses (Guglielmotti, 2003). Otros bacteriofagos de BAL también mostraron una mayor resistencia a las condiciones de almacenamiento. Luego de 18 meses, el título del fago de colección LL-H (lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT), disminuyó en un orden logarítmico durante su conservación a 4 °C, en cuatro órdenes a -20 °C y en menos de un orden a -80 °C. Para el fago temperado Ib539 (lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326), se observó una caída en la viabilidad de dos órdenes logarítmicos a 4 °C, en cuatro órdenes a -20 °C y de dos órdenes a -80 °C, en un periodo de 18 meses (Guglielmotti, 2003). Para fagos líticos de *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 (hv y ATCC 15807 B-1) se observó una disminución paulatina de su viabilidad a 4 °C, descendiendo en tres órdenes logarítmicos después de dos años. La viabilidad durante la conservación a -20 °C para el fago hv, se mantuvo constante durante los primeros ocho meses, luego de los cuales exhibió un leve descenso. En cambio, la viabilidad del fago ATCC 15807 B-1 descendió en forma más importante, cayendo tres órdenes logarítmicos en el primer año de conservación. Durante el

almacenamiento a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ambos fagos de *Lb. helveticus* mantuvieron su viabilidad luego de un año de conservación (Quiberoni, 1997). Los fagos temperados estudiados en este trabajo fueron los que menor resistencia mostraron durante la conservación, especialmente a temperaturas superiores a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### Viabilidad fágica a distintos valores de pH

Ambos fagos temperados mostraron alta resistencia dentro de un amplio rango de pH (pH = 4 - 9), siendo constante su recuento luego de 30 minutos de tratamiento.

Para Cb1/204 se observó una mayor sensibilidad en condiciones ácidas. A pH 3 y 30 minutos de exposición se observó una completa inactivación del fago, mientras que para Cb1/342 se requirió un pH menor (pH = 2) para la inactivación total de las partículas virales. Como se observa en la figura 1, el título de este fago no se vio afectado luego de media hora de tratamiento a pH 3. Ambos bacteriofagos fueron igualmente resistentes a la alcalinidad. A pH 10, más del 99% de la población fágica fue inactivada. Sin embargo, no hubo una completa eliminación en ninguno de los casos (Fig. 1).

Contrariamente, para los fagos BYM y YAB, valores de pH menores a 5 disminuyeron el número de partículas activas de forma considerable, y la viabilidad se mantuvo alta sólo entre pH 5 y 8. El fago Ib<sub>3</sub> fue igualmente estable en este rango, pero el número de partículas que permanecieron activas para todos los valores de pH fue mucho menor (60% de la población) (Quiberoni y col., 2004). Los bacteriofagos autóctonos líticos de *Streptococcus thermophilus*, mostraron mejor tolerancia a un rango mayor de pH en comparación a los fagos líticos de *Lb. delbrueckii*, pero no respecto a los fagos temperados. Se observó una importante inactivación (> 91%) de las partículas fágicas a pH 3 y una marcada estabilidad a valores de pH entre 4 y 8,5 (Binetti, 2001). Por otro lado, fagos de *Lactobacillus casei / paracasei* (J-1 y PL-1), mostraron alta viabilidad a valores de pH entre 5 y 10, lo que implica una mayor resistencia en condiciones alcalinas que los fagos Cb1/342 y Cb1/204. Sin embargo, en condiciones ácidas se observó una disminución de la viabilidad a pH 4 (hasta un orden logarítmico para J-1) y una inactivación de más del 99% de la población en el tratamiento a pH 3 (Capra y col., 2005), a diferencia de Cb1/342 que mantuvo un alto título en estos valores de pH. Auad y col. (1997) informaron tolerancia a valores de pH entre 3 y 10 para un fago temperado de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Ib539). A pH 3, los recuentos obtenidos para Ib539 fueron un orden menor a los valores

iniciales, mientras que Cb1/342 se mantuvo constante en estas condiciones. A pH 10 el fago Ib539 mostró mayor resistencia que los fagos utilizados en este trabajo, ya que su viabilidad se mantuvo constante, mientras que para Cb1/342 y Cb1/204 hubo una inactivación de más del 99% de las partículas virales.

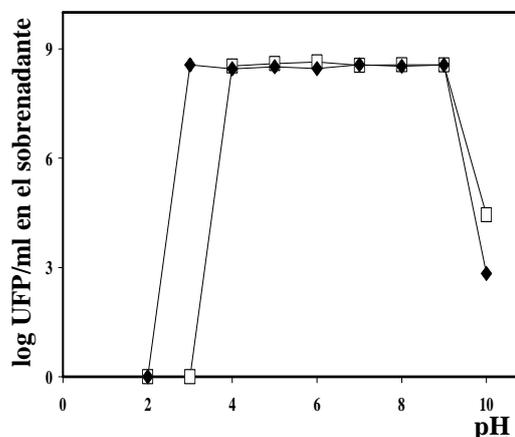


Figura 1. Viabilidad a distintos pH, luego de 30 minutos de incubación a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , de los fagos (◆) Cb1/342 y (□) Cb1/204.

#### Cinéticas de muerte térmica

Los tratamientos térmicos usados masivamente en la industria láctea son:  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$  - 30 minutos (LTLT),  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  - 15 segundos (HTST) y  $82\text{ }^{\circ}\text{C}$  - 5 minutos (leche destinada a yogur). En el último caso, se trata de una nueva temperatura implementada en el tratamiento de la leche en la producción de yogur para la cual no han sido reportados ensayos previos sobre su efecto en otros bacteriofagos de BAL.

Los fagos estudiados mostraron una escasa resistencia térmica. Como muestra la Tabla 1, los valores de  $T_{99}$  obtenidos fueron muy bajos ( $T_{99} \leq 2,4$  min). Sin embargo, el tratamiento a  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$  realizado en leche no inactivó la totalidad de las partículas fágicas iniciales en ninguno de los casos. Si bien la mayoría de la población se destruyó en los primeros minutos de tratamiento, una fracción resultó termorresistente y permaneció activa durante los 30 minutos del ensayo. En MRS, la inactivación completa se observó a los 20 minutos para Cb1/342 y a los 10 minutos para Cb1/204 (Fig. 2).

A  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el fago Cb1/204 resultó claramente más resistente. Durante el tratamiento en leche, el  $T_{99}$  obtenido fue mayor que para Cb1/342 (Tabla 1) y la inactivación completa se produjo a los 20 minutos, mientras que para el fago Cb1/204 sólo se necesitaron 5 minutos de exposición. Además, sólo 2 minutos resultaron suficientes para eliminar completamente la población del fago Cb1/342 cuando se utilizó caldo MRS

como medio de suspensión. Para Cb1/204 fueron necesarios 5 minutos para obtener los mismos resultados (Fig. 3).

Los tratamientos a 82 °C y 90 °C aplicados a la leche antes de ser destinada a la elaboración de yogur, aseguraron la eliminación de ambos fagos a los 2 minutos de ensayo.

Los fagos líticos de *Lb. delbrueckii* (BYM, YAB y Ib<sub>3</sub>) mostraron menor sensibilidad a los tratamientos térmicos (Quiberoni y col., 2003). A 63 °C, no se produjo inactivación completa de ninguno de ellos y se obtuvieron T<sub>99</sub> > 45 minutos en LDR, y T<sub>99</sub> ≥ 27,9 minutos en caldo MRS. Durante los estudios realizados a 72 °C, se observó una reducción más rápida del número de partículas activas (T<sub>99</sub> < 3 minutos), pero la pérdida absoluta de viabilidad se produjo, en general, a mayores tiempos de exposición respecto a los fagos temperados. A 82 °C y 90 °C, en 5 minutos hubo una completa destrucción de los fagos YAB y BYM. El fago Ib<sub>3</sub> mostró una alta termorresistencia cuando se utilizó LDR como medio de suspensión, siendo necesarios 15 minutos de tratamiento a 82 °C y 90 °C para eliminar completamente este fago. Quiberoni y col. (2003) también informaron para el fago de colección LL-H (lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*) alta sensibilidad al tratamiento térmico, ya que únicamente fue capaz de mantenerse activo durante los estudios realizados en LDR a 63 °C (T<sub>99</sub> = 15,8 min). Sin embargo, de acuerdo a lo expuesto anteriormente, resulta más resistente que los fagos temperados. Similares resultados se observaron para fagos líticos de *Lb. helveticus* (Quiberoni y col., 1999), fagos autóctonos de *Streptococcus thermophilus* (Binetti y Reinheimer, 2000), *Lactococcus lactis* (Suárez y Reinheimer, 2002) y *Lb. paracasei* (Capra y col., 2004). En la mayoría de los casos, los tratamientos a 63 °C no fueron suficientes para la inactivación completa de las partículas virales, requiriéndose calentamientos durante más de 30 minutos para eliminar el 99% de la población fágica, cuando se utilizó LDR. El tratamiento a 72 °C resultó más eficiente (menores T<sub>99</sub>), pero no siempre se produjo la inactivación completa de los virus. A 90 °C, con excepción del fago Ib<sub>3</sub>, se produjo la inactivación total de todos los fagos a los 5 minutos de tratamiento (o antes).

En general, se observó una clara influencia del medio de suspensión utilizado en la resistencia térmica de los fagos. Esto indicaría un efecto protector de los componentes de la leche. Algunos autores sugieren que los lípidos de la misma contribuyen al aumento de resistencia térmica a través de la adsorción de éstos a la superficie de las partículas virales (Guglielmotti, 2003). Es interesante señalar que

la inactivación térmica de bacteriofagos de BAL no sigue una cinética de primer orden, sino que esta cinética puede separarse en dos o tres componentes lineales. Se observa un rápido decrecimiento de la concentración viral durante el primer período de tratamiento, siguiendo una cinética de primer orden aproximadamente hasta la destrucción del 90% de las partículas. Luego, la velocidad de inactivación disminuye hasta el final del tratamiento. Esto podría explicarse por la heterogeneidad en el fenotipo termorresistencia presente en la población fágica. La presencia de una pequeña proporción de fagos resistentes al calor provocaría la disminución de la velocidad en la cinética observada. Además, el agrupamiento de las partículas virales también podría ser un factor físico que explique el comportamiento bimodal de la inactivación (Suárez y col., 2003). Cabe destacar que la porción termorresistente que queda activa luego de los procesos de pasteurización puede propagarse e interferir con el normal desarrollo de los fermentos. Según los resultados observados, los tratamientos de pasteurización de alta y baja temperatura no fueron efectivos en todos los casos, por lo que la materia prima sería una vía primaria importante de entrada de los fagos a las plantas de elaboración.

Tabla 1. Resistencia térmica de los fagos temperados de *Lb. delbrueckii* en distintos medios de suspensión, expresada como tiempo (min) para lograr el 99% de inactivación de las partículas fágicas (T<sub>99</sub>)

		Fago	Cb1/342	Cb1/204
T <sub>99</sub> (min)	LDR	63 °C	< 2,0	2,4
		72 °C	<2,0	2,1
		82 °C	<2,0	< 2,0
	Caldo MRS	63 °C	< 2,0	< 2,0
		72 °C	< 2,0	< 2,0
		82 °C	< 2,0	< 2,0

## CONCLUSIONES

Los bacteriofagos temperados mantienen una alta viabilidad en un rango de pH amplio, permaneciendo estables bajo condiciones tanto ácidas como alcalinas. Sin embargo, no hemos realizado estudios de la influencia del pH en la adsorción a sus cepas sensibles, por lo que no

podemos indicar si este factor tiene incidencia en la infección de las bacterias por parte de Cb1/342 y Cb1/204.

Por otro lado, de acuerdo a los resultados observados, pasteurizaciones de alta y baja temperatura (72 y 63 °C, respectivamente) no son suficientes para la eliminación de los fagos Cb1/342 y Cb1/204 en leche, pero sí los tratamientos a 82 °C y 90 °C. Sin embargo, estas últimas temperaturas no aseguran la completa inactivación de todos los bacteriofagos de *Lb. delbrueckii*, ya que son necesarios mayores tiempos a los utilizados para la eliminación del fago Ib<sub>3</sub>. La baja eficiencia de los tratamientos térmicos aplicados a la leche cruda confirmaría que la materia prima es una de las vías principales de entrada de fagos a la planta.

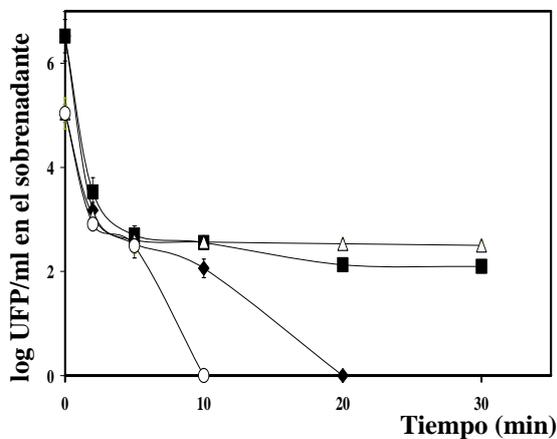


Figura 2. Curvas de inactivación térmica a 62 °C, en LDR y caldo MRS, para los fagos temperados Cb1/342 (■,◆) y Cb1/204 (△,○), respectivamente.

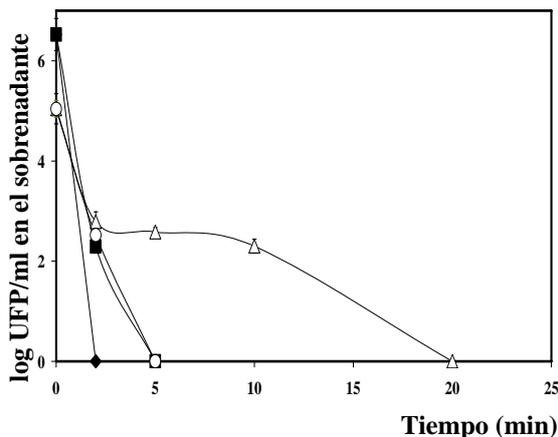


Figura 3. Curvas de inactivación térmica a 72 °C, en LDR y caldo MRS, para los fagos temperados Cb1/342 (■,◆) y Cb1/204 (△,○), respectivamente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Auad, L., A.P. Ruiz Holgado, P. de Forsman, T. Alatosava, y R. Raya (1997), Isolation and characterization of a new *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* temperate bacteriophage, *Journal of Dairy Science*, Vol. 80, pp. 2706-2712.
- Binetti, A.G. (2001), Bacteriofagos autóctonos de *Streptococcus thermophilus*: aislamiento, caracterización y obtención de mutantes fago resistentes, Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral.
- Binetti, A.G. y J.A. Reinheimer (2000), Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants, *Journal of Food Protection*, Vol. 63(4), pp. 509-515.
- Bruttin, A., F. Desiere, N. D'Amico, J-P. Guérin, J. Sidoti, B. Huni, S. Luccini y H. Brüssow (1997), Molecular ecology of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage infections in cheese factory, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63(8), pp. 3144-3150.
- Brüssow, H., M. Frémont, A. Bruttin, J. Sidoti, A. Constable y V. Fryder (1994), Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60(12), pp. 4537-4543.
- Capra M.L., A. Quiberoni, y J.A. Reinheimer (2004), Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* phages, *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 38, pp. 499-504.
- Capra, M.L.; A. Quiberoni, y J.A. Reinheimer (2005), Phages of *Lactobacillus casei/paracasei*: response to environmental factors and interaction with collection and commercial strains, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 100, pp. 334-342.
- Guglielmotti, D.M. (2003), Fagos autóctonos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: caracterización y descripción de su interacción con sus cepas sensibles, Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral.

- Javis, A. W. (1989), Bacteriophages of lactic acid bacteria, *Journal of Dairy Science*, Vol. 72, pp. 3406-3428.
- Neve, H. (1996), Bacteriophage, *Dairy Starter Cultures/ ed. T.M. Cogan, y J-P. Accolas/ VCH Publishers, New York*, pp. 157-190
- Moineau, S. (1999), Applications of phage resistance in lactic acid bacteria, *Proceedings of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, 19-23 September 1999, Veldhoven, The Netherlands/ ed. W.N. Konings, O.P. Kupiers y J.H.J. Huis in't Veld/ Kluwer Academic Publishers, Veldhoven, pp. 377-382.
- Quiberoni A. (1997), Interacción de bacterias lácticas termófilas con bacteriofagos específicos, Tesis presentada para acceder al título de Doctor en Química, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral.
- Quiberoni, A., D.M. Guglielmotti y J.A. Reinheimer (2003), Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides, *Internacional Journal of Food Microbiology*, Vol. 84, pp. 51-62.
- Quiberoni, A., D.M. Guglielmotti, y J.A. Reinheimer (2004), Characterization of three *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages and the physicochemical análisis of phage adsorption, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 96, pp. 340-351.
- Quiberoni, A.L., V.B. Suárez, y J.A. Reinheimer (1999), Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments, *Journal of Food Protection*, Vol. 62(8), pp. 894-898.
- Suárez, V.B. y J.A. Reinheimer (2002), Effectiveness of Thermal Treatments and Biocides in the Inactivation of Argentinian *Lactococcus lactis* Phages, *Journal of Food Protection*, Vol. 11, pp. 1756-1759.
- Suárez, V.B., A. Quiberoni, A.G. Binetti, D.M. Guglielmotti, M.L. Capra y J.A. Reinheimer (2003), Tratamientos térmicos y químicos para prevenir infecciones por fagos de bacterias lácticas, *Revista Argentina de Lactología* N° 22, pp. 55-76.