

ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA DE FAGOS DE BACTERIAS LÁCTICAS EN UN REACTOR A ESCALA SEMI-PILOTO

Gornati, Jéscica Soledad¹

¹Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET)

Directora: Briggiler Marcó, Mariángeles

Codirector: Negro, Antonio

Área: Ingeniería

INTRODUCCIÓN

Las infecciones fágicas constituyen uno de los problemas más importantes que enfrentan los procesos fermentativos debido a que pueden causar la lisis celular de los cultivos iniciadores, produciendo un retardo o bloqueo en la fermentación, alteración de la calidad del producto y, en casos severos, la pérdida total del mismo. Como consecuencia de esto se pueden generar grandes pérdidas económicas (Fernández y col., 2017). Particularmente, la industria láctea representa el sector industrial más afectado, haciéndose imprescindible la implementación de diversas estrategias (diseño de la planta, tratamientos térmicos, implementación de programas de rotación de cultivos y de programas de sanitización, uso de cepas con fagorresistencia mejorada) tendientes a disminuir este impacto (Fernández y col., 2017). Sin embargo, ninguna de las herramientas mencionadas con anterioridad podrían aplicarse para disminuir la carga fágica en el aire ambiental. Como es sabido, los bacteriofagos permanecen en el aire constituyendo bioaerosoles, los cuales representan su principal vía de diseminación por los ambientes industriales (Verreault y col., 2011). En este sentido, Atamer y col. (2012) reportaron recuentos cercanos a 10^8 PFU/m³ de fagos en el aire. Es así que, resulta necesario limitar la formación de bioaerosoles así como también reducir su carga microbiana y viral. Diversos autores han demostrado la eficiencia de la fotocatalisis (UV-A, TiO₂ como catalizador) en la inactivación de bacterias, esporos, hongos y virus tanto en medio líquido como gaseoso (Briggiler Marcó y col., 2011). En particular, nuestro grupo de trabajo encontró que los tratamientos fotocatalíticos resultaron efectivos en la inactivación de fagos infectivos de diversas especies de bacterias lácticas en un reactor a escala de laboratorio y simulando las condiciones de bioaerosoles (Briggiler Marcó y col., 2009, 2011). Para continuar con estos estudios, se diseñó y construyó un reactor de mayor escala (escala semi-piloto) que permite el estudio de la inactivación de fagos en una corriente gaseosa (bioaerosoles). De esta manera, las condiciones se aproximarían a las de operación de un equipo en ambientes de la industria.

OBJETIVOS

- Ajustar diversas condiciones de operación para los ensayos de inactivación fotocatalítica.
- Investigar la inactivación fotocatalítica de fagos de bacterias lácticas contenidas en el aire en el reactor a escala semi-piloto diseñado.

Título del proyecto: "Diseño de estrategias innovadoras para inactivación de bacteriófagos en ambientes de la industria láctea" Código: IO-2017-00003
Instrumento: Investigación Orientada 2017
Año convocatoria: 2017
Organismo financiador: Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación (ASaCTel)
Director/a: Mariángeles Briggiler Marcó

METODOLOGIA

Descripción del reactor fotocatalítico

El reactor es un sistema cerrado con recirculación que consta de una cámara de acero inoxidable (forma cúbica, 60 cm de lado) en donde circula el aire conteniendo las partículas fágicas y un compartimento de acrílico (compartimento fotocatalítico) con 6 placas de vidrio borosilicato recubiertas con el catalizador (TiO_2) (Briggiler Marcó y col., 2017). El sistema de emisión consta de dos grupos de 10 lámparas UV (TL4W/08 F4 T5/BLB, Philips) ubicados por encima y debajo del comportamiento fotocatalítico. Las lámparas UV presentan emisión superficial dentro de un rango de longitud de onda desde 300 hasta 420 nm (UV-A) con un máximo de emisión a 350 nm. En la entrada del compartimento fotocatalítico se encuentra un ventilador axial que facilita la circulación forzada del aire proveniente de la cámara y que contiene las partículas fágicas. Por otro lado, la salida del compartimento fotocatalítico se encuentra conectada con la cámara a través de un tubo de polipropileno (100 mm de diámetro), lo que permite la recirculación del aire tratado (Figura 1) (Briggiler Marcó y col., 2017).

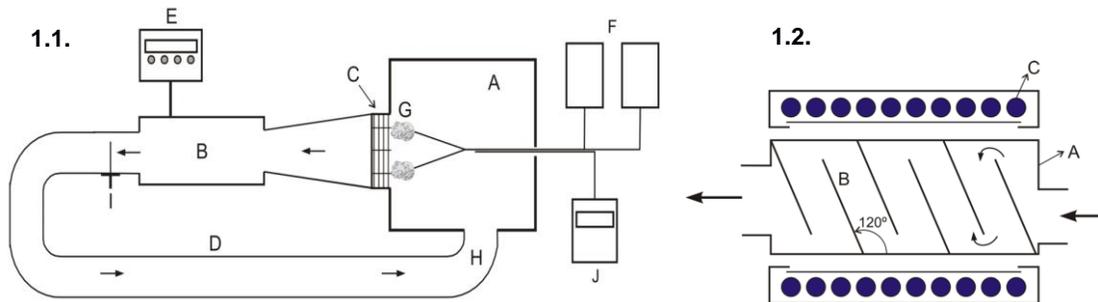


Figura 1. 1.1. Vista superior del reactor fotocatalítico. A- cámara, B-compartimento fotocatalítico, C- ventilador, D- tubo de polipropileno, E- panel de control de la lámparas UV, F- nebulizador, G- soporte nebulizador, H e I- puntos de toma de muestra, J- termohigrómetro. **1.2.** Compartimento fotocatalítico. A- caja de acrílico, B- placas de vidrio de borosilicato, C- lámparas UV.

Puesta a punto de condiciones de operación del reactor

Para la puesta a punto de las condiciones de operación del reactor, se utilizó el fago B1 (infectivo de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014). En este sentido, se estudiaron las siguientes condiciones:

- *Preparación de la suspensión fágica:* con el objetivo de alcanzar recuentos fágicos elevados, las suspensiones fágicas fueron previamente concentradas por centrifugación en tubos concentradores *Vivaspin* (Sartorius, cut off de 10 Kda). Adicionalmente, se evaluó la incorporación de una etapa de concentración mediante PEG 8000 (10% m/v) previa a la de centrifugación en los tubos *Vivaspin*.

- *Método de nebulización:* se ensayaron dos tipos de nebulizadores, dos a pistón (marca Silfab) trabajando en serie y por otro lado, el nebulizador *Collison 6-jet* (Keika Ventures). El tiempo de nebulización fue de 20 min (nebulizador a pistón) y 60 min (nebulizador *Collison*), mientras que el volumen nebulizado fue de aproximadamente 7 ml y 19 ml, respectivamente.

- *Humedad relativa dentro del reactor*: se estudió la influencia de la humedad relativa sobre la distribución de las partículas fágicas en el interior del reactor y su correspondiente muestreo. Estos estudios incluyeron valores de 73% (normalmente alcanzado durante los ensayos) y de 46% (mediante el uso de gel de sílice en la cámara).

Ensayos de inactivación fotocatalítica

Para los ensayos de inactivación fotocatalítica, se estudiaron dos fagos: fago B1 (cepa sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014) y LDG (cepa sensible *Leuconostoc pseudomesenteroides* R707). Las suspensiones fágicas concentradas fueron diluidas (1:10) en agua destilada estéril y nebulizadas en el interior de la cámara. Los ensayos de inactivación como función del tiempo se llevaron a cabo tanto en presencia como en ausencia de radiación UV durante 60 min (tiempo total) desde que comenzó el proceso de nebulización. El muestreo se realizó, a los 30 y 60 min, por impacto del aire conteniendo las partículas fágicas sobre un portaobjeto de vidrio (7,5cm x 2,5cm) estéril colocado a la salida del compartimento fotocatalítico. Posteriormente, el portaobjeto se colocó en una bolsa Whirl-Pak conteniendo 10 ml de agua destilada estéril para su posterior agitación durante 30 minutos (agitador Boekel, Rocker II, modelo 260350). De esta manera se favorece la difusión de los viriones al medio líquido para su posterior titulación mediante el método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991). Adicionalmente, se midió la temperatura y la humedad relativa en el interior de la cámara mediante un termohigrómetro (Smart Sensor, Houston, TX).

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Puesta a punto de condiciones óptimas de operación del reactor

Cuando el fago B1 fue concentrado mediante PEG y centrifugación en los tubos concentradores *Vivaspin*, se observó un aumento de 2 órdenes log en los títulos fágicos, alcanzándose recuentos de aproximadamente $2,5 \times 10^{11}$ UFP/ml. Si bien, mediante la concentración en tubos *Vivaspin* (sin la etapa de concentración con PEG), el aumento en los recuentos fue menor (1,5 órdenes log, recuentos de $7,0 \times 10^{10}$ UFP/ml), la suspensión fágica resultó más clara y limpia y por ende más adecuada para ser sometida al proceso de nebulización y tratamiento fotocatalítico.

Los resultados demostraron una mejor *performance* del nebulizador *Collison* ya que fue posible nebulizar un volumen mayor de suspensión fágica (en comparación al obtenido con los nebulizadores a pistón). Además, generó un tamaño de gota menor por lo que la suspensión nebulizada permaneció un tiempo más prolongado en el aire. Asimismo, se observó que la nebulización durante 30 minutos, fue suficiente para alcanzar recuentos fágicos constantes en el interior del reactor.

Con respecto a la humedad relativa, este parámetro no tuvo influencia en la distribución/muestreo del fago B1 por lo que los ensayos se llevarán a cabo sin modificar la humedad relativa en el interior del reactor debido a que además representan mejor a las condiciones encontradas en los ambientes de la industria láctea (alta humedad).

Por lo tanto, las condiciones seleccionadas para los ensayos de inactivación fotocatalítica fueron: concentración de la suspensión fágica mediante centrifugación en tubos concentradores, utilización del nebulizador *Collison* por 30 min como método de nebulización y humedad relativa cercana a 73%.

Ensayos de inactivación fotocatalítica

Para el fago B1, los recuentos fueron de aproximadamente $2,0 \times 10^4$ PFU/ml mientras el nebulizador estuvo funcionando (30 min). Cuando el proceso de nebulización finalizó, se observó una disminución en los títulos fágicos tanto en presencia como en ausencia de radiación UV-A. En este sentido, en ausencia de radiación (debido al fenómeno de adsorción de las partículas fágicas sobre el reactor) se observó una disminución de 0,7 órdenes log mientras que se obtuvo una caída de 1,8 órdenes log en presencia de luz UV. Estos recuentos fágicos fueron obtenidos 30 min después de haber finalizado el proceso nebulización. Un comportamiento similar se observó para el fago LDG, ya que durante la nebulización se obtuvieron recuentos de $1,6 \times 10^4$ UFP/ml y luego de finalizada la misma, caídas de 1 orden log y 2,9 órdenes log en ausencia y presencia de radiación UV-A, respectivamente. La temperatura y humedad relativa en el interior de la cámara durante los ensayos experimentales fueron de 27°C y 73%, respectivamente.

En conclusión, se ajustaron diversas condiciones como el método de concentración de fagos y el de nebulización así como también la humedad relativa en el interior del reactor para los ensayos de inactivación fotocatalítica. Por otro lado, se observó que los fagos B1 y LDG contenidos en bioaerosoles se inactivaron parcialmente dentro de los 30 min mediante la aplicación de tratamientos fotocatalíticos en un reactor a escala semi-piloto. Actualmente se están desarrollando estudios que incluyen otros fagos de diversas especies de bacterias lácticas, comúnmente utilizadas en los procesos fermentativos industriales.

BIBLIOGRAFÍA

Atamer Z., Neve H., Heller K.J., Hinrichs J., 2012. Thermal resistance of bacteriophages in the dairy industry. En: Bacteriophages in dairy processing (Eds. Quiberoni A, Reinheimer J) Nova Science Publishers, Inc., pp. 195-214.

Briggiler Marcó M., De Antoni G.L., Reinheimer J.A., Quiberoni A., 2009. Thermal, chemical and photocatalytic inactivation of *Lactobacillus plantarum* bacteriophages. Journal of Food Protection, 72, 1012-1019.

Briggiler Marcó M., Negro A.C., Alfano O.M., Quiberoni A., 2017. New semi-pilot scale reactor to study the photocatalytic inactivation of phages contained in aerosol. *Environmental science and pollution research*, doi: 10.1007/s11356-017-8994-5.

Briggiler Marcó M., Quiberoni A., Negro A.C., Reinheimer J.A., Alfano O.M., 2011. Evaluation of the photocatalytic inactivation efficiency of dairy bacteriophages. Chemical Engineering Journal, 172, 987-993.

Fernández L., Escobedo S., Gutiérrez D., Portilla S., Martínez B., García P., Rodríguez A., 2017. Bacteriophages in the Dairy Environment: From Enemies to Allies. *Antibiotics*, 6, 27: 1-14.

Svensson V., Christiansson A., 1991. Methods for phage monitoring. FIL-IDF Bulletin 263, 29-39.

Verreault D., Gendron L., Rousseau G.M., Veillette M., Massé D., Lindsley W.G., Moineau S., Duchaine C., 2011. Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 491-497.