

BACTERIOFAGOS AISLADOS DE LACTOSUERO: RESISTENCIA A TRATAMIENTOS DE SANITIZACIÓN

Oliver, Giuliana

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET)

Directora: Suárez, Viviana Beatriz

Codirectora: Briggiler Marcó, Mariángeles

Área: Ingeniería

Palabras claves: industria láctea, derivados de lactosuero, infecciones fágicas

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevas tecnologías, como la concentración por membranas, ha permitido reutilizar el suero de quesería, tradicionalmente considerado un desecho industrial altamente contaminante del medio ambiente, convirtiéndolo en un ingrediente valioso para la industria alimentaria. El agregado de derivados de suero de quesería (fundamentalmente WPC, *Whey Protein Concentrate*) en la elaboración de nuevos productos lácteos fermentados es utilizado por muchas industrias, con diversos objetivos. Sin embargo, nuestro grupo ha demostrado (Briggiler Marcó y col., 2022) que estas muestras de WPC contienen fagos infectivos de bacterias ácido lácticas (BAL), muchas veces presentes en concentraciones elevadas. Si estos compuestos se adicionaran a procesos fermentativos sin ningún tipo de control, podrían provocar graves pérdidas económicas al infectar a las BAL del cultivo iniciador, ya que el proceso no se realizaría de la manera adecuada. La presencia de estos fagos se podría justificar por la alta concentración en la que se suelen encontrar en los sueros de quesería (Atamer y col., 2013). Si bien esta materia prima se somete a tratamientos térmicos, generalmente suaves, antes de su concentración y secado, muchas veces no son suficientes para disminuir en alto grado y menos aún para eliminar completamente los potenciales fagos presentes (Atamer y col., 2009; Atamer y col. 2013; Capra y col., 2013; Wagner y col., 2017). Por otra parte, la óptima higiene de los equipos de planta, de los ambientes y de las superficies de trabajo es indispensable al momento de mantener “controlada” la concentración de fagos en la industria. Los agentes sanitizantes utilizados para tal fin en la industria de alimentos pueden dividirse en aquellos destinados al laboratorio y los que se emplean para la higiene de la planta. Está descrito, para fagos de BAL, que aquellos que resultan más resistentes a la actividad frente a los biocidas sobreviven a un amplio espectro de estos (Briggiler Marcó y col., 2019).

Por todo lo detallado anteriormente, este trabajo apunta al estudio del efecto de tratamientos de sanitización (térmicos y químicos) usualmente utilizados en nuestra industria láctea, a fin de aportar conocimiento y herramientas concretas para el diseño o modificación de procesos (en lo que fuese posible) y minimizar, de este modo, riesgos de infecciones fágicas cuando se utilizan estos compuestos (WPC) como aditivos en procesos fermentativos.

Título del proyecto: “Bacteriofagos en derivados de lactosuero: evidencia de la problemática y estrategias para enfrentarla en el sector productivo” Código: IO-2019-00112

Instrumento: Investigación Orientada 2019

Año de convocatoria: 2019

Organismo financiador: Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación (ASaCTel)

Director/a: Quiberoni, Andrea; Co-Directora: Suárez, Viviana

OBJETIVOS

Evaluar la eficiencia de diversos tratamientos de sanitización (por temperatura y biocidas) sobre fagos seleccionados de *Streptococcus thermophilus* aislados de muestras de WPC utilizadas en nuestro país.

METODOLOGÍA

Cepas y fagos

Se estudiaron 17 fagos infectivos de cepas comerciales de *St. thermophilus*, aislados a partir de muestras de concentrados de proteínas de suero (WPC) comercializadas en nuestro país (Briggiler Marcó y col., 2022). Los fagos se seleccionaron en base a su capacidad infectiva, persistencia en sueros de origen y pertenencia a distintos grupos genéticos (8 fagos *cos*, 2 fagos *pac* y 7 fagos 5093). Los fagos fueron propagados en caldo M17 a 37 °C y la cuantificación (Unidades Formadoras de Placas, UFP/mL) se realizó utilizando el método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991).

Tratamientos de sanitización

Partiendo de concentraciones fágicas (títulos) entre 10^6 y 10^7 UFP/mL, se evaluó:

- **Resistencia térmica:** a 75, 80 y 85 °C durante 5 min, en buffer TMG (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄, y 0,1% w/v gelatina, pH 7,4) (resistencia intrínseca) (Briggiler Marcó y col., 2022).
- **Resistencia a biocidas:** se ensayaron distintos biocidas, cuya composición y condiciones de uso se muestran en la Tabla 1 (Pujato y col., 2014).

Tabla 1: Biocidas usados en los ensayos de inactivación de fagos

Biocida	Composición	Concentración (Temperatura; pH final)	Tiempo	Uso
A	Hipoclorito de sodio	100 ppm y 200 ppm (25 °C; 7,05)	5 y 20 min	Laboratorio
B	Cloruro de amonio cuaternario	1 y 2% (25 °C; 10 – 10,5)	5 y 20 min	Laboratorio
C	Ácido peracético	0,15% (40 °C; 2,9)	5 min	Planta
D	Nonilfenol etoxilado y ácido fosfórico	0,8 % (40 °C; 2,10)	5 min	Planta
E	p-toluensulfoncloro amida, sal de sodio	Puro (25 °C; 9,14)	30 min	Planta
F	Peróxido de hidrógeno, ácido peracético, ácido peroctanoico	0,13 % (25 °C; 3,31)	5 min	Planta
G	Ácido fosfórico y ácido nítrico	0,5 % (45 °C; 2,1)	30 min	Membranas
H	Soda caustica, tensioactivo iónico	0,2 % (45 °C; 10,7)	30 min	Membranas

Se determinó el título fágico antes y después de cada tratamiento y se procedió a determinar el porcentaje de inactivación (%) para cada fago, calculado como:

$$\% \text{ inactivación} = \frac{\log C_i - \log C_f}{\log C_i} * 100$$

Los resultados se obtuvieron por triplicado, en ensayos independientes. Se realizaron análisis estadísticos descriptivos de caja y bigotes y reducción de variables (factorial de componentes principales) para análisis de comportamiento grupal.

RESULTADOS / CONCLUSIONES

Desinfectantes: los biocidas C, D, F y G, utilizados según las indicaciones del fabricante, lograron eliminar completamente todos los fagos estudiados. El mismo efecto se logró para el biocida A con una concentración de 200 ppm y para el biocida B al 2 % (v/v), ambos aplicados durante 20 min. Para los biocidas A y B (en las otras dos condiciones testeadas), E y H, los resultados obtenidos fueron bastante disímiles y se pudo observar que el efecto fue muy variable dependiendo del fago. No se pudo encontrar una clara relación entre la acción de los biocidas y

el grupo genético al cual pertenecen. La capacidad de inactivación del biocida H fue muy baja en todos los casos.

En la Fig. 1 se muestra el comportamiento para cada grupo genético frente a los distintos biocidas. Los fagos *pac*, por ser 2, obviamente no se incluyeron en este análisis. Se puede observar que, en general, los fagos *cos* presentaron un comportamiento mucho más disperso que los 5093, lo que se evidencia en la longitud de las cajas. En algunos casos (biocida H) se pudo verificar una distribución prácticamente normal para este grupo. También se observó una mayor sensibilidad general de los fagos 5093 a todos los biocidas ensayados (salvo en el biocida E).

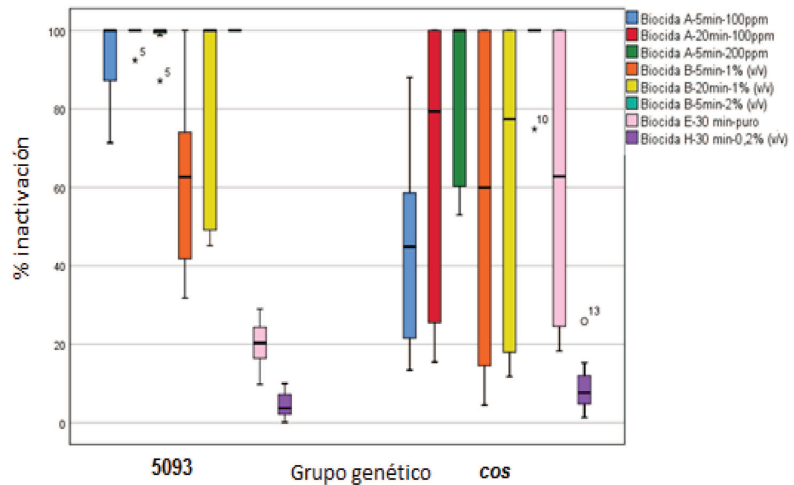


Figura 1- Análisis de cajas y bigotes para los distintos tratamientos con biocidas de los fagos según el grupo genético

El análisis estadístico de reducción de variables (Análisis de Componentes Principales) (Fig. 2) permitió simplificar el sistema y expresar la influencia de cada factor (cada uno de los biocidas en las distintas condiciones) en un sistema cartesiano de dos nuevos componentes, PCA 1 y PCA 2, que lograron explicar el 91,5 % de las variables originales.

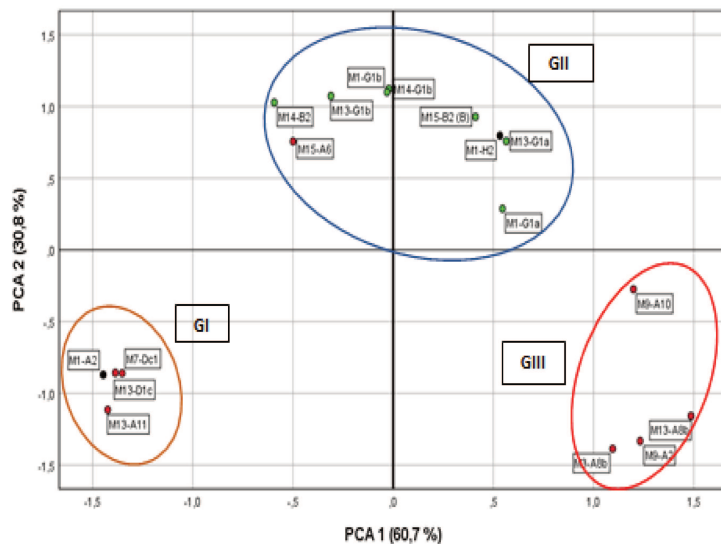


Figura 2- Análisis de Componentes Principales para los distintos tratamientos con biocidas de los fagos

Se puede observar que los fagos 5093 (verde) se comportaron de manera similar, agrupándose en GII, siendo los más afectados por el biocida A y los menos por el biocida H (según el diagrama de *loadings*, no mostrado). Uno de los fagos *pac* (negro) también se ubicó en este grupo. La dispersión observada para los fagos *cos* en el diagrama de caja y bigotes se vuelve a observar en este tratamiento (rojo). Estos fagos se comportaron distinto a los 5093 (salvo 1 de ellos) agrupándose en GI y GIII. Los primeros, junto con uno de los fagos *pac*, mostraron ser menos resistentes que los del GIII al biocida B, mientras que su resistencia fue un poco menor para el biocida A y mucho mayor al E y H (datos no mostrados)

Tratamientos térmicos: el tratamiento de 75 °C eliminó completamente los fagos *pac*, mientras que para los otros grupos la inactivación fue mínima. A 80 °C, los fagos *cos* mostraron ser más sensibles que los 5093, lográndose la inactivación total de 3 de los 8 fagos *cos* estudiados. El tratamiento de 85 °C durante 5 min logró la inactivación total (< 10 UFP/mL) en todos los casos.

En el diagrama de caja y bigotes (Fig. 3) se puede observar que, a 75 °C, los fagos de ambos grupos (*cos* y 5093) se comportan de manera bastante similar, con baja dispersión de valores (salvo un punto atípico para 5093) y una mediana (valor que marca el 50 % de la población) menor para 5093. A 80 °C, se reveló claramente la mayor sensibilidad de los fagos *cos*, con una mediana alrededor del 55 % frente al 18 % de los 5093, y una dispersión de respuesta mucho mayor, con valores (4 fagos) ubicados entre el 55 % y el 100 % de inactivación.

Los resultados demostraron una gran variabilidad en el comportamiento de los fagos autóctonos aislados de muestras de WPC utilizadas en la industria láctea de nuestro país frente a ciertos biocidas, y es evidente que no se puede generalizar en relación a la capacidad de inactivación de los mismos. Consecuentemente, es recomendable realizar un examen cuidadoso y regular de los biocidas disponibles frente a nuevos fagos emergentes, juntamente con la implementación de un diagrama de rotación de compuestos utilizados para aumentar la eficiencia de desinfección.

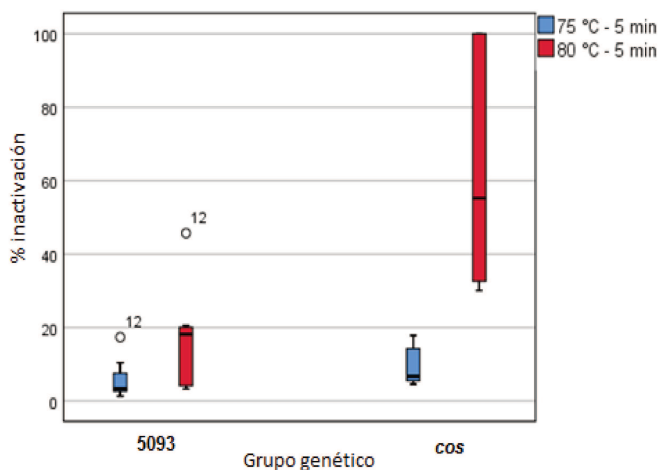


Figura 3- Análisis descriptivo de cajas y bigotes para el tratamiento térmico de los fagos según el

En relación a la resistencia térmica de estos fagos, ha quedado claramente expuesto que los tratamientos de pasteurización usados en leche cruda y suero de quesería destinado a producción de WPC no inhiben a la mayoría de los fagos presentes; de hecho, fueron necesarios tratamientos más enérgicos (85 °C - 5 min) para la eliminación completa de la población en todos los casos. De acuerdo a estos resultados sería aconsejable evaluar, en base al producto a ser elaborado, la posibilidad de intensificar el tratamiento térmico realizado a la materia prima de manera de lograr un mejor control de estas infecciones.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Atamer Z., Dietrich J., Müller-Merbach M., Neve H., Heller K.J., Hinrichs J. (2009). *International Dairy Journal* 19, 228-235.
- Atamer Z., Samtlebe M., Neve H., Heller K., Hinrichs J. (2013). *Frontiers in Microbiology* 4, 1-9.
- Briggiler Marcó M, Machado N, Quiberoni A, Suárez V. (2022). *Viruses* 14, 810, 1-16.
- Briggiler Marcó M., Suárez V., Quiberoni, A., Pujato, S. (2019). *Viruses* 11, 480-508.
- Capra M.L., Neve H., Sorati P.C., Atamer Z., Hinrichs J., Heller, K.J., Quiberoni A. (2013). *International Dairy Journal* 30, 59-63.
- Pujato S.A., Guglielmotti, D.M., Ackermann H.W., Patrignani F., Lanciotti R., Reinheimer J.A., Quiberoni A. (2014). *International Journal of Food Microbiology* 177, 81-88.
- Svensson V., Christiansson A. (1991). *FIL-IDF Bulletin* 263, 29-39.
- Wagner N., Samtlebe M., Franz C., Neve H., Heller K, Hindrichs J., Atamer Z. (2017). *International Dairy Journal* 68, 95-104.