



PINTURAS FOTOCATALÍTICAS PARA LA INACTIVACIÓN DE FAGOS DE BACTERIAS LÁCTICAS

María Jacob

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN – UNL)

Directora: Mariángeles Briggiler Marcó

Codirectora: María de los Milagros Ballari

Área: Ingeniería

Palabras claves: Industria láctea, Inactivación fágica, Pinturas fotocatalíticas.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas son ampliamente utilizadas para la producción de alimentos fermentados. Sin embargo, la industria láctea fermentativa es afectada comúnmente por infecciones por bacteriofagos, un grave problema que provoca la lisis celular de los cultivos empleados (iniciadores y probióticos), conduciendo a un retardo o bloqueo en la fermentación y, en consecuencia, a una pérdida total del producto o disminución de su calidad/seguridad. A pesar de que existen diversas estrategias para la inactivación de los fagos no es posible lograr la erradicación total de los mismos, por lo que es necesario desarrollar nuevas estrategias para utilizar en conjunto con las ya empleadas y así mantener las infecciones bajo control durante las fermentaciones industriales. Las estrategias que se aplican normalmente en los ambientes de elaboración son: el diseño de la planta con una adecuada distribución de las áreas dentro del sector de producción, la correcta higiene y adecuada desinfección de equipos y utensilios, la aplicación de tratamientos térmicos a la materia prima para disminuir su carga microbiana que podría además reducir su contenido viral, así como también la rotación de cultivos empleados en los procesos productivos (Briggiler Marcó y Mercanti, 2021). Desde hace unos años, nuestro grupo de trabajo se encuentra estudiando los procesos avanzados de oxidación como estrategia para la inactivación de fagos. Entre ellos se destaca la fotocatalisis heterogénea, que emplea diversos semiconductores como fotocatalizadores, siendo el TiO_2 el más utilizado, y radiación UV-A (Briggiler Marcó y col., 2021). Sin embargo, el TiO_2 solo puede ser activado por radiación UV (200-400 nm), lo que representa aproximadamente un 4% de la energía solar; mientras que la radiación visible constituye el 45% de la misma. Para ampliar el uso de la fotocatalisis al espectro visible, es necesario prolongar el rango de absorción de radiación del TiO_2 . El dopaje del fotocatalizador con metales o no metales es una de las estrategias que se utiliza para tal fin. Una de las

Título del proyecto: Fagos de bacterias lácticas presentes en ambientes de la industria láctea: optimización de estrategias de inactivación. Código IO-2019-00001
Instrumento: Investigación Orientada 2019
Año convocatoria: 2019
Organismo financiador: Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación (ASaCTel)
Director/a: Briggiler Marcó, Mariángeles



aplicaciones emergentes de la fotocatalisis heterogénea es la combinación de fotocatalizadores con materiales de construcción para aportarles propiedades autolimpiantes y descontaminantes del aire. Tal es el caso de pinturas fotocatalíticas, las cuales pueden ser formuladas con TiO₂ anatasa dopado con carbono para permitir que el proceso fotocatalítico se active con la radiación de los mismos ambientes donde son aplicadas (Salvadores y col., 2020). Es así que la utilización de pinturas fotocatalíticas bajo radiación de ambientes interiores se posicionaría como una posible estrategia efectiva para el control fágico en las industrias lácteas fermentativas en conjunto a las ya existentes. Entre sus principales ventajas se puede mencionar el control *in situ* de bioaerosoles con carga fágica, la fácil aplicación en los ambientes industriales (paredes y superficies), y la sustentabilidad energética, ya que puede aprovechar la luz del ambiente. Sin embargo, resulta indispensable conocer la eficiencia de las pinturas en la inactivación de fagos de bacterias lácticas.

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue investigar la inactivación de 9 fagos infectivos de bacterias lácticas mediante la aplicación de pinturas fotocatalíticas (TiO₂ dopado con carbono) irradiadas con una fuente de iluminación típica de ambientes interiores (360-720 nm). Se evaluó la inactivación de los fagos en función del tiempo, determinando las constantes de inactivación.

METODOLOGÍA

Los fagos estudiados en el presente trabajo se muestran en la Tabla 1 junto con su cepa sensible y fuente de aislamiento. A excepción de los fagos J-1 y ATCC 8014-B1, todos los fagos fueron aislados de productos lácteos argentinos defectuosos.

Tabla 1. Fagos involucrados en el estudio.

Fago	Cepa sensible	Fuente de aislamiento
QF9	<i>Lactococcus lactis</i> CI2	Suero de queso Danbo
CHD		Suero de queso Fynbo
J-1	<i>Lacticaseibacillus casei</i> ATCC 27139	Colección ATCC
MLC-A	<i>Lacticaseibacillus casei</i> A	Producto lácteo probiótico
8014-B1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014	Colección ATCC
LDG	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> R707	Queso azul
BYM	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> YSD V	Yogur
M1-WPC 2	<i>Streptococcus thermophilus</i> WPC2	Concentrado de proteínas de suero
M14-WPC2		

Ensayos de inactivación fágica

Las experiencias se llevaron a cabo en un reactor de laboratorio estático irradiado por 7 lámparas fluorescentes de 8 W, con un rango de emisión entre 360 a 720 nm (Zacarías y col., 2018). Para los ensayos, las suspensiones fágicas fueron diluidas en agua destilada estéril (concentración final 10⁵-10⁷ Unidades Formadoras de Placas, UFP/mL), depositadas (20 µL) sobre placas de vidrio borosilicato recubiertas con pintura fotocatalítica (depositada mediante la técnica de *dip-coating*) y secadas en un ambiente estéril. La pintura fotocatalítica formulada está compuesta por agua (30% p/p), resina acrílica de estireno (33% p/p), CaCO₃ (18% p/p), TiO₂ anatasa dopado con carbono (18% p/p) y un agente dispersante (1% p/p) (Salvadores y col., 2020). Los ensayos de inactivación fueron realizados en función del tiempo, durante 16 horas (tiempo total), tomando muestras a intervalos establecidos y realizando la cuantificación de los fagos por el método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991).

Además de los ensayos de inactivación, se realizaron los controles correspondientes: placa sin pintura, con radiación (control i) y placa con pintura, sin radiación (control ii). La humedad y temperatura dentro del reactor se mantuvieron constantes (80%, 30°C) durante los experimentos.

Se realizó una regresión exponencial de los resultados experimentales (UFP/mL vs. tiempo) de acuerdo a la cinética de inactivación de primer orden (Ecuación (1)), donde UFP_0 son las Unidades Formadoras de Placas iniciales, t es el tiempo de irradiación y k_T es una constante de inactivación total, que combina una constante de inactivación fotocatalítica, k_{PH} , y una de inactivación no fotocatalítica, k_{NPH} , de acuerdo a la Ecuación (2). Utilizando los datos experimentales del control i se puede obtener k_{NPH} correspondiente a la inactivación fotoquímica de cada fago y, por diferencia con k_T , determinar k_{PH} .

$$UFP = UFP_0 \times e^{-k_T \times t} \quad (1)$$

$$k_T = k_{PH} + k_{NPH} \quad (2)$$

RESULTADOS/CONCLUSIONES

El comportamiento observado al aplicar pinturas fotocatalíticas y radiación visible fue fago-dependiente. En este sentido, luego de 2 horas, los fagos CHD y QF9 disminuyeron su título en 4,7 y 5,1 órdenes log, respectivamente, luego del tratamiento. Por otro lado, los fagos BYM y J-1 redujeron su infectividad en 3,9 y 4,4 órdenes log, respectivamente, luego de 3 horas. Al cabo de 5 horas, se obtuvieron reducciones en los títulos fágicos de 3,4 (fago M1-WPC2) y 2,9 (fago M14-WPC2) órdenes log. Para los fagos 8014-B1, LDG y MLC-A se estudiaron mayores tiempos debido a la resistencia al tratamiento más alta evidenciada para estos fagos. Así, las caídas en los títulos para estos tres fagos fueron de 2,7 (fago 8014-B1 a las 9 horas), 2,2 (fago LDG a las 16 horas) y 4,4 (fago MLC-A a las 16 horas) órdenes log (Figuras 1, 2 y 3). Asimismo, los fagos QF9, CHD, BYM y J-1 se inactivaron completamente (< 50 UFP/mL) a las 3 horas (fagos QF9 y CHD), 4 horas (fago BYM) y 5 horas (fago J-1) de tratamiento con pinturas fotocatalíticas.

En relación a los resultados obtenidos para los controles, no se observó disminución de la infectividad fágica en presencia de las pinturas y ausencia de radiación (control ii). En general, se observó el mismo comportamiento en ausencia de pinturas y presencia de radiación (control i) a excepción de los fagos CHD, MLC-A, 8014-B1 y QF9, con reducciones en los títulos de 2,5, 2,7, 2,7 y 3,4

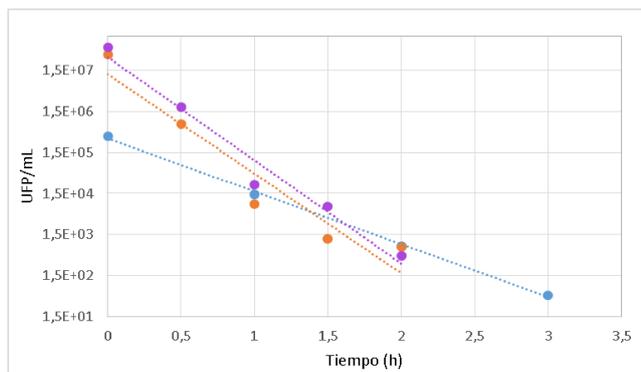


Figura 1. Curvas de inactivación para los fagos BYM (azul), CHD (naranja) y QF9 (violeta).

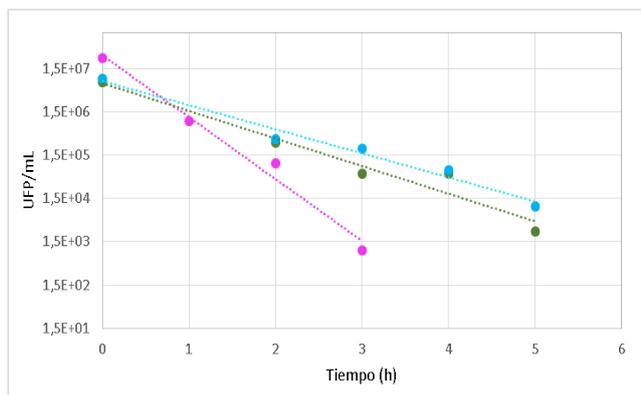


Figura 2. Curvas de inactivación para los fagos J-1 (fucsia), M1-WPC2 (verde) y M14-WPC2 (celeste).

órdenes log, respectivamente. Para ambos controles el tiempo total de ensayo correspondió al máximo tiempo evaluado en presencia de pinturas y radiación.

Sobre las gráficas de inactivación (UFP/mL vs tiempo) se realizaron regresiones exponenciales, a partir de las cuales se obtuvieron los valores de k_T , de acuerdo a la Ecuación (1). Los valores de k_T obtenidos para los distintos fagos se muestran en la Tabla 2 y se encuentran entre 1,28 y 5,79 1/h. Teniendo en cuenta que un mayor valor de k_T indica una inactivación más rápida, se puede concluir

que la sensibilidad de los fagos estudiados al tratamiento con pinturas fotocatalíticas sigue el orden: QF9 > CHD > J-1 > BYM > M1-WPC2 > M14-WPC2 > MLC-A > 8014-B1 > LDG. Como se mencionó anteriormente, los fagos MLC-A, 8014-B1, CHD y QF9 también mostraron inactivación en los ensayos del control i, lo que se refleja en su valor de k_{NPH} (0,35; 0,38; 1,42; 1,95 1/h, respectivamente). Este control indicaría que algunos fagos son sensibles a una inactivación fotoquímica.

Se demostró que las pinturas fotocatalíticas (TiO_2 dopado con carbono, radiación visible) son efectivas en tiempos relativamente cortos de tratamiento para la inactivación de fagos de bacterias lácticas. Su aplicación sobre diversas superficies y paredes en los ambientes de producción y utilizando el propio sistema de iluminación contribuiría con la reducción de la carga viral de los bioaerosoles limitando la posibilidad de diseminación de los viriones por los diversos ambientes de las plantas industriales. En ensayos futuros, se pretende incluir en el estudio

otros fagos infectivos de bacterias lácticas así como también analizar la influencia de diversos factores tales como humedad, radiación UV, diversos flujos de radiación incidente (uso de filtros) en la inactivación de fagos.

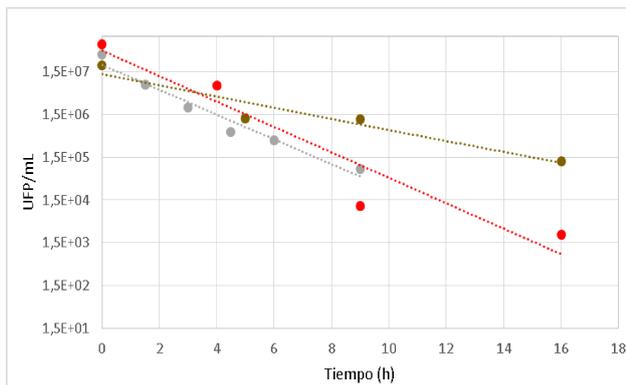


Figura 3. Curvas de inactivación para los fagos MLC-A (rojo), 8014-B1 (gris) y LDG (marrón).

Tabla 2. Constantes de inactivación para los fagos estudiados.

Fago	k_T (1/h)	k_{NPH} (1/h)	k_{PH} (1/h)
QF9	5,79	1,95	3,84
CHD	5,59	1,42	4,17
J-1	3,42	0,45	2,97
BYM	2,82	0,17	2,65
M1-WPC 2	1,47	0	1,47
M14-WPC2	1,28	0	1,28
MLC-A	0,69	0,35	0,34
8014-B1	0,67	0,38	0,29
LDG	0,30	0,25	0,05

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Briggiler Marcó M., Ballari M.M., Gornati J.S., Alfano O.M., Quiberoni A.L. 2021. Photocatalytic inactivation of dairy bacteriophages contained in aerosol: Comparative evaluation of efficiencies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 409, 113130, 1-8.

Briggiler Marcó M., Mercanti D.J. 2021. Bacteriophages in dairy plants. En: *Advances in Food and Nutrition Research*, Fidel Toldrá (Editor), Academic Press/Elsevier. Amsterdam. 97, 1-54.

Salvadores F., Alfano O.M., Ballari M.M. 2020. Kinetic study of air treatment by photocatalytic paints under indoor radiation source: Influence of ambient conditions and photocatalyst content. *Appl. Catal. B Environ.* 268, 118694.

Svensson U., Christiansson A. 1991. Methods for phage monitoring. *FILIDF Bulletin* 263, 29-39.

Zacarías S.M., Marchetti S., Alfano O.M., Ballari M.M. 2018. Photocatalytic paint for fungi growth control under different environmental conditions and irradiation sources. *Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry* 364, 76-87.