Bacterias deterioradoras y su control con bacteriófagos

Alexia Joana López Gachuzo, Sofía Ma. Arvizu Medrano, Mauricio A. Redondo Solano, Dalia E. Miranda Castilleja, Silvia L. Amaya Llano. Universidad Autónoma de Querétaro.
Contacto: alexia-joana@outlook.com

Resumen

El deterioro de alimentos involucra cambios físicos y químicos indeseables de los productos, que hace que sean inaceptables para el consumidor. Las bacterias ácido lácticas (BAL) y ácido acéticas (BAAC) actúan como deterioradoras en bebidas fermentadas, por lo que producen biopelículas y elevan la viscosidad de dichos productos; además pueden tener actividad durante la fermentación, maduración y almacenamiento de las bebidas alcohólicas como vino, sidra y cerveza. Una estrategia de control para la actividad de estas bacterias puede ser los bacteriófagos, que son virus específicos que infectan solamente bacterias. Estos virus se han probado en alimentos cárnicos y lácteos, sin embargo su aplicación podía ampliarse a otras matrices alimentarias. El objetivo fue aislar e identificar BAL y BAAC deterioradoras de bebidas fermentadas para evaluar su susceptibilidad a bacteriófagos; para ello se aislaron estos microorganismos de aguas residuales, superficies y productos de cervecerías artesanales. Se probaron cepas de BAL y BAAC con bacteriófagos aislados. Seis cepas de BAL mostraron susceptibilidad a una concentración de bacteriófagos de $1x10^4$ UFP/ml, ya que redujeron la población de BAL en células suspendidas 3-4 Log UFC/ml. El bacteriófago “N” tuvo efecto en tres cepas diferentes de BAL. Mediante la prueba de puntos, 3 cepas de BAAC fueron susceptibles a 3 fagos distintos. En este estudio se demostró que algunas cepas de BAL en suspensión y de BAAC son susceptibles a bacteriófagos y, que algunos bacteriófagos, ejercen efecto antimicrobiano sobre más de un tipo específico de bacterias. Algunos bacteriófagos muestran potencial para aplicarse en bebidas fermentadas para prevenir su deterioro.

Palabras clave
Bebidas fermentadas, bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas, bacteriófagos, deterioro de cerveza.

Abstract

Food spoilage involves undesirable physical and chemical changes to products, which make them unacceptable to the consumer. Lactic acid (LAB) and acetic acid (AAB) bacteria act as spoilage in fermented beverages, producing biofilms and raising the viscosity of these products; they can also be active during the fermentation, maturation and storage of alcoholic beverages such as wine, cider and beer.

A control strategy for the activity of these bacteria could be bacteriophages, which are specific viruses that infect only bacteria. These viruses have been tested in meat and dairy foods, however, their application could be extended to other food matrices.

The objective of this work was to isolate and to identify spoiler LAB and AAB of fermented beverages to evaluate their susceptibility to bacteriophages; For this, these microorganisms were isolated from wastewater, surfaces and craft brewery products. LAB and AAB strains were challenged with the isolated bacteriophages. Six strains of LAB showed susceptibility to a bacteriophage concentration of $1x10^4$ PFU / ml, showing 3-4 Log CFU / ml reduced LAB. Bacteriophage "N" showed effect on three different strains of LAB. Through point test, 3 AAB strains were susceptible to 3 different phages.

In this study, it was shown that some strains of LAB and AAB are susceptible to bacteriophages, and that some bacteriophages exert antimicrobial effect on more than one specific type of bacteria. Some bacteriophages show potential to be applied in fermented beverages to prevent spoilage.

Keywords
Fermented beverages, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, bacteriophages, beer spoilage.

Introducción

El incremento global de la población tiene como resultado un aumento en la demanda de alimentos. Estos últimos tienen la probabilidad de desperdiciarse, en mayor o menor medida, en todo el mundo y en todas las etapas de la cadena alimentaria. Las pérdidas de alimentos afectan negativamente la seguridad alimentaria y la nutrición de las poblaciones (Petruzzi y col., 2017).

El deterioro de alimentos se puede generar por actividad de ácaros o insectos, actividad enzimática o reacciones químicas propias del alimento y, la más frecuente, es la actividad microbiana misma que involucra varios mecanismos que afectan las características sensoriales de los alimentos. Lo anterior es resultado de cambios en la textura, el sabor, el aroma e incluso el color y, por ello, los consumidores el alimento (Li y col., 2020). Además de la presencia de microorganismos deterioradores, el pH, la temperatura, la disponibilidad de agua y nutrientes, así como el uso de conservadores son elementos clave durante el almacenamiento (Gill, 2017).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) juegan un papel importante en el deterioro de diversos alimentos, entre ellos las bebidas fermentadas. Este grupo de bacterias producen principalmente ácido láctico a partir de la degradación de azúcares; suelen ser tolerantes a niveles bajos de pH, producen polímeros y son capaces de generar biopelículas. Estas características favorecen su persistencia en ambientes de producción de alimentos en donde otras bacterias suelen inhibirse (Ferrero y col., 2021).

Las BAAC son bacterias Gram negativas catalasa positiva y oxidasa negativa. Son bacterias aerobias obligadas que pertenecen a la familia *Acetobacteraceae* y tienen un pH óptimo de desarrollo entre 5.0-6.5, pero existen reportes que pueden crecer a valores más bajos (La China, 2018). Estas bacterias son utilizadas para llevar a cabo reacciones específicas de oxidación a través de fermentaciones oxidativas, especialmente en la producción de vinagre y también pueden deteriorar bebidas fermentadas como el vino, la sidra y la cerveza donde la producción de ácido acético es indeseable (La China, 2018). Este fenómeno puede ocurrir si las BAAC no se eliminan durante la filtración o antes del embotellado y su actividad puede impartirles un aspecto turbio a las bebidas (Gomes y col., 2018).

Las estrategias de control que actualmente se utilizan contra el deterioro de los alimentos se basan en minimizar el ingreso de los microorganismos deterioradores mediante procesos de limpieza y desinfección de superficies y el control de la calidad microbiológica; así como el uso de conservadores, empaques y atmósferas que inhiban el desarrollo microbiano. Sin embargo, no se ha descrito alguna estrategia específica para el control de BAL y BAAC.

Por otro lado, los bacteriófagos son los virus más abundantes en todo el planeta y están presentes en todos los ecosistemas. Se definen como parásitos intracelulares obligados que infectan exclusivamente a células procariotas (Sharma et al., 2017). Estos virus se han convertido en agentes importantes para el control de las bacterias, principalmente en tratamientos clínicos debido a que cada vez es mayor la resistencia de las bacterias a los antibióticos, por lo que se han vuelto una opción eficiente en este ámbito (Kortright et al., 2019). La aplicación de los bacteriófagos no solamente se limita al área médica, también se han aplicado en la agricultura para proteger cultivos y en alimentos procesados como bioprotectores, en donde se busca eliminar bacterias patógenas como *Escherichia coli* patógena, *Salmonella* y *Listeria* (Huang y col., 2018).

Por esta razón el objetivo de este estudio es aislar e identificar BAL y BAAC deterioradoras de cerveza y evaluar su susceptibilidad a bacteriófagos aislados del mismo ambiente de producción.

Metodología

Para el aislamiento de los microorganismos, se realizaron 6 muestreos de superficies y productos en cervecerías artesanales y bodegas de vino. Se utilizaron hisopos y esponjas estériles sumergidos en 2 y 20 ml de caldo neutralizante. Se inocularon diluciones seleccionadas de cada muestra por extensión en superficie en agar MRS y agar GYC para el aislamiento de BAL y BAAC, respectivamente. Las placas se incubaron a 30 °C/24 h para BAL y a 25 °C/48 h para BAAC. La confirmación de las BAL y BAAC se realizó mediante pruebas bioquímicas (catalasa y oxidasa) y morfológicas (tinción Gram). Para el caso de las BAL, se aplicó una prueba de PCR múltiple como tamiz de identificación.

Para la recuperación de bacteriófagos, alícuotas de las muestras obtenidas se centrifugaron a 10,000 rpm / 5 min. El sobrenadante se filtró con una membrana de acetato de celulosa (0.45µm) y esto se enriqueció en 1 ml de cultivo activado de cepas de BAL y BAAC y se incubaron a 30 °C/24 h y a 25 °C/48 h respectivamente. Nuevamente, se centrifugó y se filtró la solución y los bacteriófagos se cuantificaron mediante la técnica de agar doble capa en el medio específico para cada tipo de bacteria.

Se evaluó la capacidad de deterioro de las cepas aisladas inoculando 40 µl de cada una de ellas en 10 ml de cerveza artesanal tipo pilsner y se incubaron a 30 °C/24 h para BAL y a 25 °C/48 h para BAAC. Se midió cada 12 horas la densidad óptica (DO) de las soluciones durante 72 h.

La evaluación del efecto de los bacteriófagos en células en suspensión se realizó inoculando 10^8 UFC / ml de cepas individuales de BAL con 10^4 UFP / ml de la suspensión de bacteriófagos y se incubaron a 30 °C/24 h. Posteriormente, se centrifugó la suspensión a 10,000 rpm / 5 min y el paquete celular se resuspendió en solución salina isotónica para la cuantificación de las células sobrevivientes de BAL en agar MRS.

La susceptibilidad de las BAAC a los bacteriófagos se realizó mediante la prueba de puntos, en la cual se probaron todos los bacteriófagos en un ensayo. Para ello, se adicionaron 500 µl de cada una de las cepas de BAAC en 3 ml de agar semisólido, el cual se vertió sobre una placa de agar GYC sólido. Una vez seco este agar, se colocó una gota de 10 µl de cada uno de los bacteriófagos para evaluar si eran eficientes con cada una de las cepas.

Resultados

En los seis muestreos que se realizaron, se obtuvieron un total de 9 bacteriófagos y 82 cepas bacterianas; de las cuales, 13 se confirmaron como BAL y mediante PCR, 2 de ellas se identificaron como *Leuconostoc mesenteroides* (C-5) y *Lactobacillus plantarum* (C-10) y 3 cepas como BAAC.

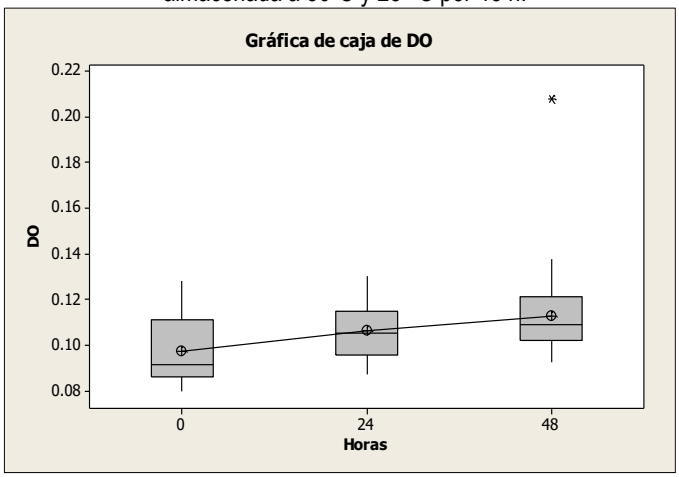
Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en el estudio.

Tipo de bacteria	Origen	Sitio de muestreo	Código
BAL	Bodega vinícola	Coladera	C-1
BAL	Bodega vinícola	Tanque	C-2
BAL	Bodega vinícola	Tótem	C-3
BAL	Bodega vinícola	Tótem	C-4
BAL	Bodega vinícola	Caja	C-5
BAL	Cervecería	Coladera	C-6
BAL	Cervecería	Coladera	C-7
BAL	Cervecería	Enlatadora	C-8
BAL	Cervecería	Enlatadora	C-9
BAL	Cervecería	Tanque	C-10
BAL	Cervecería	Piso	C-11
BAL	Cervecería	Tanque	C-21
BAL	Cervecería	Mosto	C-25
BAAC	Cervecería	Válvula	C-13
BAAC	Cervecería	Manguera	C-16
BAAC	Cervecería	Mesa	C-19

Fuente: Elaboración propia.

Las cepas de BAL y de BAAC mostraron capacidad para desarrollar en cerveza artesanal (Figura 1). Se observó un incremento en la densidad óptica (DO) de la cerveza inoculada con las cepas de manera individual y almacenada por 48 h ($p < 0.05$).

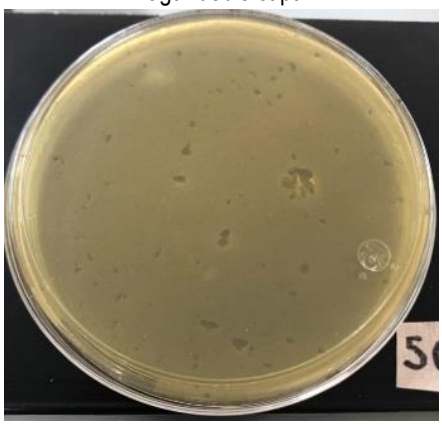
Figura 1. Desarrollo de 13 cepas de BAL y 9 de BAAC en cerveza almacenada a 30ºC y 25 °C por 48 h.



Fuente: Elaboración propia.

Además, la comparación de Dunnett con la cerveza sin inocular mostró que la media de la DO alcanzada a las 48 h es significativamente diferente que la media del control, el cual consistió en cerveza almacenada a las mismas condiciones, pero sin inocular. Se retaron 9 bacteriófagos aislados con 13 cepas de BAL en suspensión y seis de ellas mostraron susceptibilidad a cuatro de los bacteriófagos (Figura 2). Como resultado, el bacteriófago "N" fue el más eficiente ya que mostró efecto contra tres cepas diferentes de BAL (Tabla 1).

Figura 2. Inhibición bacteriana mediante bacteriófagos y la ´prueba de agar doble capa.



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2. Actividad de los bacteriófagos sobre BAAC y BAL.

Bacteriófago	Cepas susceptibles
K	C-19, C-3
M	C-5
N	C-2, C-7, C-9
O	C-10
P	C-13
S	C-16

Fuente: Elaboración propia.

A través de la prueba de puntos se obtuvieron tres cepas de BAAC susceptibles a los fagos "O", "P" y "S".

Discusión y conclusiones

Recientemente, la producción de cerveza no pasteurizada ha aumentado debido a la preferencia de los consumidores por el sabor fresco; pero al excluir la pasteurización, el producto final es más susceptible al deterioro por microorganismos. El uso de bacteriófagos como conservadores es una manera de controlar el problema al que se enfrentan principalmente las cervecerías artesanales.

En México, es muy importante la producción de cerveza artesanal: en el 2013, se abrieron más de 276 cervecerías artesanales (Cerveceros de México, 2020). En particular, Querétaro es un estado reconocido por su producción de cerveza artesanal, donde se cuenta con empresas importantes que figuran tanto en el mercado nacional como internacional de acuerdo con los datos estadísticos que presentó el INEGI en el 2020.

Durante la elaboración de cerveza artesanal, es muy común encontrar BAL en equipos y productos debido a su capacidad de formación de biopelículas y su tolerancia a bajos niveles de pH (Rodríguez Saavedra et al., 2020). Las BAL también se han encontrado en el producto terminado, ya que este tipo de cervezas no se pasteurizan, lo cual favorece la supervivencia y desarrollo de BAL (Rodríguez Saavedra et al., 2020). *Lactobacillus brevis*, *L. paracasei*, *L. backii* y *Pediococcus damnosus* son las especies que se han visto mayormente implicadas en casos de deterioro de cerveza (Schneiderbanger et al., 2018).

Las BAL son microorganismos que se encuentran en diversos ambientes de producción de alimentos. Reportaron la persistencia de cepas deterioradoras de *Leuconostoc* en una empresa productora de salchichas por dos años (Padilla et al., como se citó en Ripolles Ávila, 2019). Así mismo, se ha observado el deterioro en jamón cocido rebanado durante el empacado al vacío por la acción de *Leuconostoc* y *Weissella* que son capaces de producir cambios perceptibles en los cárnicos como lo son la acidez y exudados. La industria láctea tampoco está exenta del deterioro por BAL, ya que en la producción de leche y queso se ha demostrado que, al tener una temperatura mayor a 4° C, estos microorganismos son capaces de formar biopelículas y deteriorar el alimento durante su almacenamiento (Xu et al, 2020).

Las estrategias de intervención actuales para prevenir la actividad de microorganismos responsables del deterioro y mejorar la seguridad de la cerveza incluyen pasteurización, filtración, sulfatación y estrictas prácticas de limpieza y saneamiento. Al utilizar desinfectantes como el hipoclorito de sodio, la reducción de las bacterias suele ser limitada (en promedio es de 2-3 Log UFC); además de los efectos que pueden generar la descarga de estos compuestos químicos en el ambiente o en el consumidor debido a residuos en el alimento (Fraser y col., 2021) y además existe una fracción de la población que muestra alergia a los sulfitos. Otra alternativa es el uso de levaduras, ya que algunas de ellas secretan toxinas que inhiben el crecimiento de hongos y bacterias deterioradoras. Por otra parte, también se ha estudiado el uso de bacterias con actividad antagónica para inhibir completa o parcialmente el crecimiento de bacterias no deseadas; esto debido a la competencia, exclusión o desplazamiento que hay entre las bacterias (Choi et al., 2018)

La relación BAL y bacteriófagos se ha estudiado principalmente en productos lácteos fermentados, en donde la presencia de estos virus es indeseable porque detiene la actividad de los cultivos iniciadores que da las características organolépticas propias de estos alimentos (Pujato, 2019). En contraste, investigaciones recientes han demostrado la capacidad de los bacteriófagos para actuar como métodos naturales de conservación de alimentos, aunque hasta la fecha solo se han realizado unos pocos estudios sobre bacteriófagos que infectan a BAL (Feyereisen y col., 2019).

El deterioro de la cerveza por BAAC suele presentarse por la formación de biopelículas, turbidez e incluso por provocar una pérdida de alcohol acompañada de la formación de ácido acético, lo cual vuelve a la cerveza más densa con sabores desagradables y cambios en el color. Para evitar estos problemas por deterioro, en la actualidad se aplican buenas prácticas de saneamiento y se utiliza mayormente acero inoxidable en los equipos y superficies de producción para facilitar la limpieza y desinfección. Las principales BAAC que deterioran la cerveza son *Gluconacetobacter xylinus*, *Acetobacter pasteurianus* y *Gluconobacter oxydans* (Attchelowa et al., 2018).

En el presente trabajo, los bacteriófagos que mostraron capacidad antimicrobiana fueron aislados de las superficies de llenado de la cerveza, en donde se dificulta los procesos de higienización. Con esto, se propicia la persistencia de BAL y BAAC, que pueden llegar al producto terminado (Feyereisen et al, 2019). El estudio de bacteriófagos como bioconservadores en la industria alimentaria se ha desarrollado a partir del 2006, cuando su uso fue aprobado por la FDA en Estados Unidos. Comercialmente, se han probado en alimentos como cárnicos, lácteos y hortalizas en bacterias como *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria* (Li y col., 2021); lo que hace una buena opción el uso de bacteriófagos como una estrategia de reducción e incluso eliminación de microorganismo. Se requiere caracterizar los bacteriófagos aislados, profundizar en los mecanismos de inhibición y en la optimización del proceso para generar una estrategia confiable y certera para aplicarse en la industria.

Referencias bibliográficas

Attchelouwa, C. K., N'guessan, F. K., Aké, F., & Djè, M. K. 2018. Molecular identification of yeast, lactic and acetic acid bacteria species during spoilage of tchapalo, a traditional sorghum beer from Côte d'Ivoire. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 34(11), 1-10.

Cerveceros de México. 2020. *Conociendo la agroindustria cervecera. INEGI*. https://cervecerosdemexico.com/estadisticas-a-proposito-de

Choi, A. R., Patra, J. K., Kim, W. J., & Kang, S. S. 2018. Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food. Frontiers in microbiology, 10(8): 979-983

Ferrero, F., Tabacco, E., Piano, S., Casale, M., & Borreani, G. 2021. Temperature during conservation in laboratory silos affects fermentation profile and aerobic stability of corn silage treated with Lactobacillus buchneri, Lactobacillus hilgardii, and their combination. Journal of Dairy Science, 104(2), 1696-1713.

Feyereisen, M., Mahony, J., Lugli, G. A., Ventura, M., Neve, H., Franz, C. M., ... y Van Sinderen, D. 2019. Isolation and characterization of *Lactobacillus brevis* phages. Viruses. 11:393.

Fraser, A. M., Anderson, J., Goncalves, J., Black, E., Starobin, A., Buckley, D., ... & Hollingsworth, J. 2021. Sanitizers and disinfectants: A retail food and foodservice perspective. Food Protection Trends, 41(3), 358-367.

Gill, A. 2017. The importance of bacterial culture to food microbiology in the age of genomics. Frontiers in Microbiology. 8:777-780.

Gomes, R. J., Borges, M. D. F., Rosa, M. D. F., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinosa, W. A. 2018. Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. Food Technology and Biotechnology. 56:139-151.

Huang, C., Shi, J., Ma, W., Li, Z., Wang, J., Li, J., & Wang, X. 2018. Isolation, characterization, and application of a novel specific Salmonella bacteriophage in different food matrices. Food research international, 111, 631-641.

Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L., & Turner, P. E. 2019. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. Cell host & microbe, 25(2), 219-232.

La China, S., Zanichelli, G., De Vero, L., & Gullo, M. 2018. Oxidative fermentations and exopolysaccharides production by acetic acid bacteria: a mini review. Biotechnology letters, 40(9), 1289-1302.

Li, H., Sun, X., Liao, X., & Gänzle, M. 2020. Control of pathogenic and spoilage bacteria in meat and meat products by high pressure: Challenges and future perspectives. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 19(6), 3476-3500.

Li, J., Zhao, F., Zhan, W., Li, Z., Zou, L., & Zhao, Q. 2022. Challenges for the application of bacteriophages as effective antibacterial agents in the food industry. Journal of the Science of Food and Agriculture, 102(2), 461-471.

Petruzzi, L., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. 2017. Microbial spoilage of foods: Fundamentals. In The microbiological quality of food. Woodhead Publishing. 1-21

Pujato, S. A., Quiberoni, A., & Mercanti, D. J. 2019. Bacteriophages on dairy foods. Journal of applied microbiology, 126(1), 14-30.

Ripolles-Avila, C., García-Hernández, N., Cervantes-Huamán, B. H., Mazaheri, T., & Rodríguez-Jerez, J. J. 2019. Quantitative and compositional study of monospecies biofilms of spoilage microorganisms in the meat industry and their interaction in the development of multispecies biofilms. Microorganisms, 7(12), 655.

Rodríguez-Saavedra, M., de Llano, D. G., & Moreno-Arribas, M. V. 2020. Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: Microbiological quality and food safety. Food Research International, 138, 109762.

Schneiderbanger, J., Grammer, M., Jacob, F., y Hutzler, M. 2018. Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016. Journal of the Institute of Brewing. 124:173–181.

Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. 2017. Bacteriophages and its applications: an overview. Folia Microbiologica, 62:17-55.

Xu, Z., Luo, Y., Mao, Y., Peng, R., Chen, J., Soteyome, T., ... & Kjellerup, B. V. 2020. Spoilage lactic acid bacteria in the brewing industry.