

4.2 Los fagos como enemigos: problemática en fermentación de alimentos

Diapositiva 2. Bacterias del ácido láctico

Las bacterias del ácido láctico (BAL) constituyen un grupo diverso de microorganismos asociados a plantas, carne y productos lácteos. Las BAL también tienen importancia económica en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales. Se usan en la fabricación de productos lácteos como leche acidificada, yogur, suero de mantequilla y quesos.

Diapositiva 3. Interacciones fago/bacteria hospedadora

Las bacterias del ácido láctico (BAL) comprenden diferentes grupos de microorganismos, tales como *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* así como especies pertenecientes a géneros que constituyen el núcleo "industrial" de BAL como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. El género *Lactococcus* es el mejor caracterizado dentro de las BAL relacionadas con los alimentos. Como algunas cepas de *Lactococcus* pueden crecer en leche y transformar la lactosa a ácido láctico, se utilizan frecuentemente como cultivos iniciadores en las fermentaciones industriales para la producción de quesos (1). El primer efecto negativo de los bacteriófagos en la fermentación láctea se describió a mitad de los años 30 del siglo 20 (2). Independientemente de las precauciones sanitarias, la rotación de cepas iniciadoras y el desarrollo constante de nuevas cepas bacterianas resistentes a fagos, los fagos siguen siendo una de las causas principales y más serias desde el punto de vista económico de fallos en la fermentación. La lisis de células bacterianas inducida por fagos lleva a fermentaciones fallidas o lentas, una disminución en la producción de ácido y una reducción en la calidad del producto lácteo, lo que resulta en importantes pérdidas económicas (3).

Diapositiva 4. La pesadilla de un fabricante de quesos

Aquí se ve un ejemplo de un vídeo obtenido mediante microscopía en tiempo real que muestra los efectos negativos de fagos durante el proceso de fermentación. La infección de *Lactococcus lactis* por fagos virulentos que pueden causar lisis celular y muerte 1 hora después de la infección.

Diapositiva 5. Los fagos de BAL

Actualmente, los fagos de *Lactococcus* se clasifican en 10 grupos en base a su morfología y parentesco genético. Sin embargo, las 3 especies principales 936, P335 y C2 dominan la industria láctea en términos de persistencia y frecuencia de aislamiento. Los miembros de 936 y C2 solo siguen un ciclo lítico mientras que los miembros de P335 pueden seguir un ciclo lítico o integrar su genoma en el del hospedador y replicarse en tándem con el

cromosoma del hospedador, un escenario en el que se denominan fagos lisogénicos o atemperados (4).

Diapositiva 6. Mecanismos de defensa de las BAL

Al igual que otras bacterias infectadas por fagos, las bacterias del ácido láctico han evolucionado con mecanismos de defensa contra los bacteriófagos, lo que les permite sobrevivir en un ambiente lleno de sus depredadores (fagos). Estos sistemas antifagos se organizan en grupos dependiendo de su mecanismo de funcionamiento. Algunos de estos sistemas incluyen:

- (i) Inhibición de la adherencia/adsorción del fago
- (ii) Bloqueo de la inyección del ADN del fago
- (iii) Sistemas de restricción/modificación
- (iv) Sistemas de aborto de la infección fágica

Diapositiva 7. Los bacteriófagos en la planta láctea

Es importante identificar las fuentes potenciales de contaminación por fagos y limitar su entrada en el proceso de fermentación. Los fagos pueden proceder de:

Leche cruda

La fuente natural más probable de fagos virulentos es la leche cruda donde los títulos son tan bajos como 10^1 - 10^3 UFP ml^{-1} y constituye un suministro continuo de bacteriófagos en plantas lácteas (5,6). Las concentraciones de fago en leche cruda también dependen de las condiciones de la recogida, manipulación y almacenamiento de leche por el proveedor (granja), el transporte a la planta y, finalmente, la manipulación de la leche en la misma planta. También es importante recordar que la biodiversidad de fagos aumenta mediante la combinación de leches recogidas de diferentes granjas y estos números pueden ser aún más altos en leche procesada.

Concentrados de suero de leche

Las proteínas del suero se usan para la estandarización de la leche antes del proceso de fermentación o para mejorar el sabor y la textura así como el valor nutricional del producto final. Los concentrados de suero de leche pueden ser fuentes de fagos resistentes a altas temperaturas y pueden tener influencia en la calidad final del producto final (7,8).

Cultivos iniciadores

El cultivo iniciador propiamente dicho puede ser una Fuente de fagos, cuando las cepas contienen fagos atemperados. Los fagos atemperados se incorporan en el cromosoma bacteriano y su genoma se replica en sincronía con el genoma bacteriano. Muchas cepas BAL llevan profagos (9,10) que pueden inducirse del ciclo lisogénico al lítico por las

condiciones del proceso de fabricación como el calor, las sales, la acidez, bacteriocinas, la falta de nutrientes o la luz UV (11, 12). El subcultivo en serie de fagos temperados en leche puede resultar en su sustitución por un mutante virulento. La inducción de profagos a partir de múltiples cepas lisogénicas de cultivos iniciadores tiene el potencial de afectar la fermentación. La principal fuente de cepas lisogénicas son cultivos no definidos por dos motivos principales: i) La composición exacta de cepas de estos iniciadores es desconocida; ii) la eliminación de cepas lisogénicas a partir de cultivos no definidos es muy difícil.

Equipos/aire

Los fagos están presentes frecuentemente en las superficies de trabajo y necesitan la presencia de sus hospedadores bacterianos. Por ello, se encuentran a menudo en lugares donde las condiciones son favorables para el desarrollo de BAL como válvulas, grietas, conductos sin salida de las líneas de producción (lugares difíciles de limpiar y desinfectar). De forma secuencial, la manipulación de leche cruda, procesamiento de leche para la fabricación de quesos en tanques abiertos y la manipulación de suero pueden llevar a la dispersión de fagos en el aire. Los fagos virulentos pueden circular a través del aire lejos de su fuente de aerosolización debido a la habilidad de unirse a partículas pequeñas ($< 2.1 \mu\text{m}$) (13).

Estrategia de control de fagos

Limpieza y desinfección

Las operaciones clásicas de limpieza y desinfección son una parte esencial del procesamiento de leche. Los procedimientos de limpieza in situ o "cleaning-in-place" (CIP) son frecuentemente utilizados en líneas de procesamiento de leche (14). El procedimiento de limpieza puede eliminar el 90% o más de los microorganismos asociados a la superficie pero no pueden matarlos todos. La presencia de BAL entre los microorganismos residuales aumenta el riesgo de contaminación por fagos.

Diseño de un sistema de rotación de cultivos iniciadores basado en el control de la contaminación por fagos

Los cultivos iniciadores son un factor clave que influye en la diversidad de la población de fagos de una planta láctea. En el pasado, la utilización de cultivos multiespecie o multicepa no definidos era la estrategia principal para superar los problemas de producción relacionados con fagos en muchas fábricas. La estrategia de rotación de cultivos formados por múltiples cepas requiere la selección de cepas resistentes a un rango amplio de fagos, que puedan reemplazar las cepas infectadas. Además, la rotación continua de múltiples cepas durante los procesos de fermentación tiene un efecto en la coevolución de fagos y se demostró que aumenta la diversidad de fagos y su abundancia en el ambiente lácteo (15). También requiere una selección constante de cepas iniciadoras con propiedades de fermentación específicas. Una alternativa es el uso de una cepa única, altamente especializada y resistente a fagos y a sus variantes que llevan plásmidos de resistencia a fagos obtenidos a partir de cepas resistentes naturales.

Organización de la producción

Un elemento importante para limitar la dispersión de fagos en la planta láctea es la organización de la producción. El control de los riesgos de fagos en las plantas lácteas depende del desarrollo e implementación de una variedad de procedimientos como la técnica aséptica, tanques cerrados, medios que inhiben a los fagos y tratamiento con altas temperaturas de la materia prima al por mayor.

Conclusiones:

Los fagos representan una amenaza constante de pérdidas económicas en la industria láctea. Como consecuencia de esto, los microbiólogos de la industria láctea han intentado durante casi 80 años eliminar o, al menos, controlar los bacteriófagos que interfieren con la fabricación de productos lácteos fermentados. Los fagos se diseminan rápidamente en el ambiente lácteo y son difíciles de eliminar. Así, es importante entender cómo coexisten el hospedador y los fagos para comprender mejor esta relación compleja con la esperanza de encontrar soluciones sostenibles para este problema constante de la industria láctea.

Referencias:

1. Klaenhammer TR, Barrangou R, Buck BL, Azcarate-Peril MA, Altermann E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29(3) 393-409.
2. Whitehead HR, Cox GA. The occurrence of bacteriophage in lactic streptococci. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 1935;16 319–320.
3. Lawrence R C. Action of bacteriophages on lactic acid bacteria: consequences and protection. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 1978;13 129-136.
4. Mahony, J., & van Sinderen, D. (2015). Novel strategies to prevent or exploit phages in fermentations, insights from phage–host interactions. *Current opinion in biotechnology*, 32, 8-13.
5. Kleppen HP, Bang T, Nes IF, Holo H. Bacteriophages in milk fermentations: diversity fluctuations of normal and failed fermentations. *International Dairy Journal* 2011;21(9) 592-600.
6. Madera C, Monjardin C, Suarez JE. Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Applied and Environmental Microbiology* 2004;70(12) 7365-7371.

7. Atamer Z, Ali Y, Neve H, Heller KJ, Hinrichs J. Thermal resistance of bacteriophages attacking flavor-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. *International Dairy Journal*, 2011;21(5) 327-334.
8. Chopin MC. Resistance of 17 mesophilic lactic *Streptococcus* bacteriophages to pasteurization and spray-drying. *Journal of Dairy Research* 1980;47(1) 131-139.
9. Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A, Brüssow H. Prophage genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2003;67(2) 238-276.
10. Mercanti DJ, Carminati D, Reinheimer JA, Quiberoni A. Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *International Journal of Food Microbiology* 2011; 144(3) 503-510.
11. Lunde M, Aastveit AH, Blatny JM, Nes IF. Effects of diverse environmental conditions on ϕ LC3 prophage stability in *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology* 2005;71(2) 721-727.
12. Madera C, Garcia P, Rodriguez A, Suarez JE, Martinez B. Prophage induction in *Lactococcus lactis* by the bacteriocin Lactococcin 972. *International Journal of Food Microbiology* 2009;129(1) 99-102.
13. Verreault D, Gendron L, Rousseau GM, Veillette M, Masse D, Lindsley WG, Moineau S, Duchaine C. Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. *Applied and Environmental Microbiology* 2011;77(2) 491-497.
14. Simoes M, Simoes LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology* 2010;43(4) 573-583.
15. Heap HA, Lawrence RC. The contribution of starter strains to the level of phage infection in a commercial cheese factor. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 1977;12(4) 213.