

USO DE OZONO COMO ESTRATEGIA PARA LA INACTIVACIÓN DE BACTERIOFAGOS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA

Lloréns, Ruth ¹

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

Director/a: Mariángeles Briggiler Marcó

Codirector/a: María Eugenia Lovato

Área: Ingeniería

Palabras claves: Ozono, Inactivación fágica, Industria láctea

INTRODUCCIÓN

Las infecciones fágicas se consideran, mundialmente, la causa más importante de problemas de acidificación en cultivos lácticos que se utilizan en la industria láctea fermentativa (producción de quesos, yogur, leches fermentadas, etc.). El ataque por fagos causa la destrucción de las células bacterianas, obstaculizando el normal crecimiento y desarrollo de acidez por parte de los fermentos, alterando la calidad del producto y hasta, en algunos casos, produciendo la pérdida total del mismo. Esto puede conducir a grandes pérdidas económicas en el sector industrial. La presencia de fagos en estos ambientes de elaboración no puede evitarse y por ello resulta necesario estudiar nuevas alternativas de inactivación fágica (Briggiler Marcó y Mercanti, 2021).

El ozono es una alternativa para la desinfección de equipos, superficies y aire del ambiente de procesamiento de plantas industriales. Es un potente oxidante y desinfectante, efectivo (dependiendo de la concentración y tiempo de contacto, entre otras) contra bacterias, hongos, virus, esporos de bacterias y hongos y con posibilidad de aplicación en alimentos tanto en fase gaseosa como líquida. Las condiciones de aplicación del ozono (concentración y tiempo) para la inactivación de fagos de bacterias lácticas es escasamente conocida. Además de la concentración y tiempo de exposición, otros factores que pueden influir en la inactivación de microorganismos/virus al usar ozono, son la humedad relativa del ambiente y/o la presencia de compuestos orgánicos que puedan competir con los microorganismos o partículas virales en su descomposición/inactivación. Posiblemente el ozono ya se utilice en la industria láctea para la inactivación de microorganismos, sin embargo, para proponerlo (y adecuarlo) como una estrategia para disminuir los niveles de fagos de bacterias lácticas en los ambientes de elaboración, es necesario conocer y estudiar sus condiciones de aplicación, para lograr una correcta inactivación de los mismos (Dubuis y col., 2020).

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 (ASaCTeI)

Director/a: Briggiler Marcó, Mariángeles



OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo investigar la inactivación de 16 fagos de bacterias lácticas empleando ozono gaseoso, evaluando además la influencia de diversas condiciones operacionales sobre las tasas de inactivación.

METODOLOGÍA

En este trabajo se incluyeron 16 fagos infectivos de especies de bacterias lácticas de importancia industrial, que se presentan en la Tabla 1, junto con su cepa sensible y su fuente de aislamiento. La mayoría de estos fagos fueron aislados a partir de muestras defectuosas enviadas por diversas industrias lácteas del país a nuestro Instituto.

Tabla1. Fagos estudiados en este trabajo

Fago	Fuente aislamiento	Cepa hospedadora
892-LB	Concentrado de proteínas de suero	<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 892
832-B1	Colección CNRZ	<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 892
15009-ML	Concentrado de proteínas de suero	<i>Lactobacillus helveticus</i> 15009
BYM	Yogur	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V
Cb1/204	Fago temperado	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 204
Ib₃	Yogur	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> LB-Ib ₃
J-1	ATCC	<i>Lactocaseibacillus casei</i> ATCC 27139
MLC-A	Producto lácteo probiótico	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> A
ATCC 8014-B1	Colección ATCC	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014
OBJ	Suero de quesería (queso cuartirolo)	<i>Streptococcus thermophilus</i> JB15
M1-G1b	Concentrado de proteínas de suero	<i>Streptococcus thermophilus</i> G1b
M13-G1b	Concentrado de proteínas de suero	<i>Streptococcus thermophilus</i> G1b
LDG	Suero de molde (queso azul)	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> R707
Ln-9	Suero de molde (queso azul)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> L79-1
CHD	Suero de quesería (queso Dambo)	<i>Lactococcus lactis</i> Cl2
QF9	Suero de quesería (queso Fymbo)	<i>Lactococcus lactis</i> Cl2

Ensayo de inactivación de fagos.

Para los ensayos de inactivación, las suspensiones fágicas fueron diluidas (1:10) en agua destilada estéril. Posteriormente, una alícuota de 20 µl de esta dilución se distribuyó en un portaobjeto de vidrio estéril y se dejó secar en cabina de flujo laminar durante 30 min, aproximadamente. Los portaobjetos preparados de la manera descripta fueron introducidos en la cámara B-logic (FDC Diseños & Desarrollos SRL) para el tratamiento con 10 ppm de ozono gaseoso durante 30 min, tomando muestras a tiempos predeterminados. Para ello, el fago depositado sobre el portaobjeto fue recuperado con 70 µl de agua destilada estéril, realizando posteriormente las diluciones decimales seriadas correspondientes y cuantificando las partículas fágicas de acuerdo al método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991). Los resultados obtenidos a cada tiempo se compararon con el título inicial de cada fago (portaobjeto con el fago depositado, pero sin tratamiento con ozono), para conocer la inactivación de las partículas virales en función del tiempo y se graficaron (UFP/mL

vs tiempo). La humedad relativa dentro de la cámara se mantuvo en 95% durante todos los experimentos. Se seleccionó el fago MLC-A para estudiar el efecto de: medio de suspensión del fago (agua, suero de quesería y leche), material soporte donde fue depositado el fago (vidrio, acero inoxidable) y humedad relativa del ambiente (70 y 95%), sobre la inactivación de las partículas virales en presencia de 10 ppm de ozono gaseoso y durante un tiempo máximo de 30 min.

RESULTADOS

Tabla 2. Reducciones en los títulos de los fagos luego del tratamiento con 10 ppm de ozono

Fago	Reducciones log/min	Fago	Reducciones log/min
LDG	0,11	J1	0,17
MLC-A	0,13	892-LB	0,18
ATCC 8014-B1	0,14	Ib3	0,19
M13-G1b	0,14	009-ML	0,20
832-B1	0,15	BYM	0,22
QF9	0,17	CHD	0,22
M1-G1b	0,17	OBJ	0,43
Ln-9	0,17	Cb1/204	0,52

(LDG y OBJ) bajo las condiciones mencionadas y la evolución de la concentración de ozono dentro de la cámara durante los experimentos.

De los 16 fagos estudiados, 12 se inactivaron completamente (títulos menores a 10 PFU/ml) dentro de los 30 min de tratamiento con reducciones en los títulos variables entre 0,15 (fago 832-B1) y 0,52 (fago Cb1) órdenes log/min. Por el contrario, los fagos LDG, MLC-A, ATCC 8014-B1 y M13-G1b mostraron la mayor resistencia al tratamiento con 10 ppm de ozono gaseoso, no siendo completamente inactivados dentro de los 30 min y alcanzando tasas de reducción de entre 0,11 y 0,14 órdenes log/min (Tabla 2). En la Figura 1 se muestra el comportamiento de dos fagos

Por otro lado, se ha observado que el medio (suero de quesería y leche) donde el fago estuvo suspendido (y secado) produjo una reducción de las tasas de inactivación en relación a las obtenidas cuando el fago fue suspendido en agua destilada (Figura 2). En presencia de agua se observó una reducción de 0,174 de órdenes log/min mientras que en presencia de leche o suero de quesería, las mismas fueron de 0,005 y 0,028 órdenes log/min, respectivamente. Estos resultados sugieren que los componentes de los medios de suspensión podrían ejercer un efecto protector o

competencia por el consumo de ozono sobre los fagos, disminuyendo la eficacia de estos

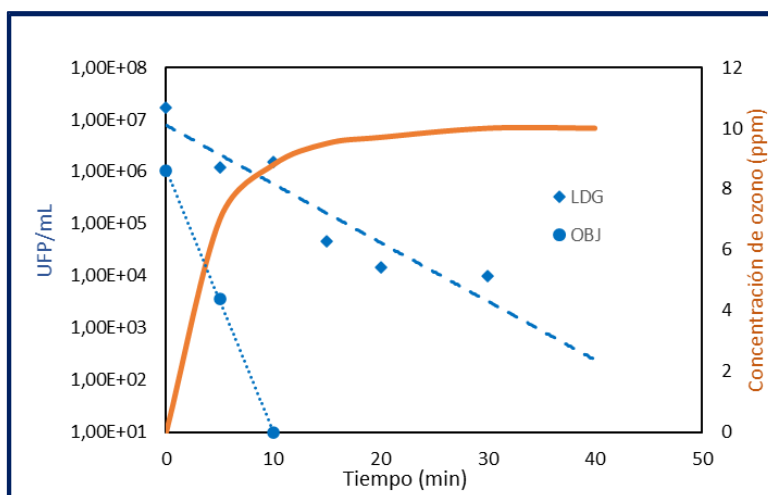


Figura 1. Inactivación de los fagos LDG y OBJ en función del tiempo (UFP/mL vs tiempo) en presencia de ozono gaseoso. Evolución de la concentración de ozono durante los experimentos.

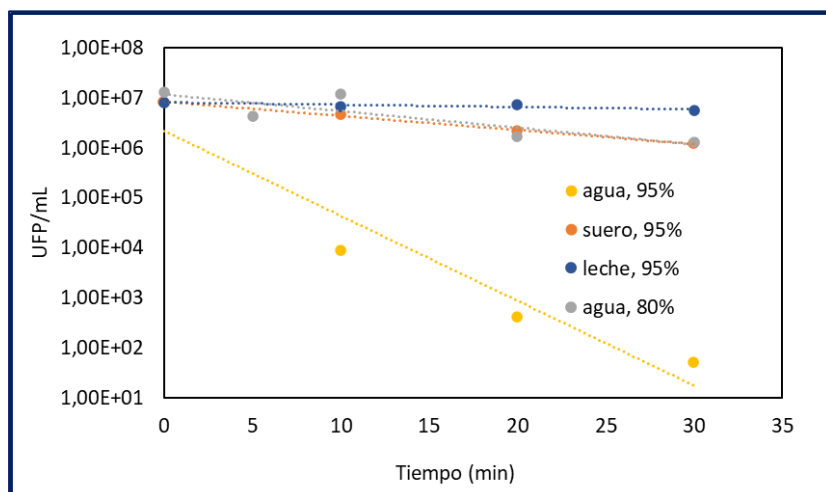


Figura 2. Inactivación del fago MLC-A en función del tiempo (UFP/mL vs tiempo) en presencia de 10 ppm de ozono y a diversas humedades relativas (80 y 95%) y medios de suspensión (agua, suero de quesería y leche)

tratamientos y dificultando la inactivación de las partículas virales. Estos hallazgos son relevantes para el desarrollo de estrategias de control y prevención de infecciones por fagos en la industria láctea.

Por el contrario, el material soporte no afectó la eficacia del tratamiento con ozono ya que similares reducciones logarítmicas por unidad de tiempo (0,156 órdenes log/min) fueron obtenidas para ambos fagos depositados sobre vidrio o acero inoxidable (datos no mostrados).

Finalmente, la eficiencia del agente oxidante se incrementó al trabajar con mayores humedades relativas dentro de la cámara (Figura 2), lo que sugiere que la reacción del ozono con el agua favorecería la formación de radicales libres, responsables (entre otros) de la inactivación de estos virus. En este caso, las reducciones obtenidas fueron de 0,145 y 0,033 órdenes log/min para 95 y 80% de humedad relativa, respectivamente.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, el uso de ozono se plantea como una estrategia a ser aplicada, en conjunto con las ya existentes, para disminuir la carga fágica en los ambientes de la industria láctea, debido a su rápida acción en concentraciones relativamente bajas, contribuyendo a reducir las implicancias tecnológicas y económicas derivadas de las infecciones fágicas. Sin embargo, resulta fundamental tener en cuenta las condiciones ambientales (como humedad relativa) así como los medios donde las partículas fágicas podrían estar suspendidas, ya que las mismas pueden influir negativamente en la eficiencia del tratamiento con ozono. Estos resultados son relevantes para el diseño de estrategias combinadas de desinfección en la industria láctea, donde las infecciones por bacteriófagos generan importantes pérdidas económicas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Briggiler Marcó, M., Mercanti, D.**, 2021 Bacteriophages in dairy plants. En: "Advances in Food and Nutrition Research" (Ed. Fidel Todrá), editado por Academic Press/Elsevier, ISBN 9780128245804, 97, 1-54.
- Dubuis, M.E., Dumont-Leblond, N., Laliberte C., Vaillette M., Turgeon N., Jean J., Duchaine C.**, 2020 Ozone efficacy for the control of airborne viruses: Bacteriophage and norovirus models. *Plos One* 15(4): e0231164.
- Svensson, V., Christiansson, A.**, 1991 Methods for phage monitoring. FIL-IDF Bulletin 263, 29-39.