

Aislamiento de un bacteriófago lítico de *Leuconostoc mesenteroides*, una bacteria deterioradora de embutidos envasados al vacío

Martínez-García, M.¹, García-Parra, M.D.¹, Solís-Sánchez, G.A.², Quiñones-Aguilar, E.E.², y Rincón-Enríquez, G.²

¹Unidad de Tecnología Alimentaria, ²Unidad de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jal. 45019, México. Correos:

dgarcia@ciatej.mx, grincon@ciatej.mx

Palabras clave: Biocontrol, bacterias ácido lácticas, virus bacterianos.

Introducción

De acuerdo con cifras de la FAO, una tercera parte de los alimentos que se producen en México, se desperdician, es decir 28 millones de toneladas al año, respecto a los alimentos procesados el 40% de los embutidos, salchichas y salchichones, se desperdician antes de ser consumidos [1]. En los embutidos, específicamente las salchichas, es muy frecuente la aparición de características indeseables, aun antes de la fecha de caducidad de estos productos, debido a la presencia de bacterias ácido lácticas (BAL) deterioradoras, entre ellas *Leuconostoc mesenteroides* [2]. Estas bacterias son capaces de sobrevivir a los métodos de conservación tradicionales [3]. Entonces es necesario el desarrollo de nuevas estrategias adicionales que no implique la adición de más compuestos químicos. En este contexto, se encuentran los antagonistas naturales de las bacterias: los bacteriófagos para su biocontrol. Se trata de virus que actúan como parásitos obligados de las bacterias que, mediante sus mecanismos de replicación, causan la lisis bacteriana sin comprometer la inocuidad de los alimentos donde son aplicados. El uso de estos bacteriófagos o sus enzimas líticas, representa una opción viable que debe ser investigada, debido a que se trata de un campo poco explorado, hasta el momento solo han sido usados con gran éxito en la industria alimentaria en la desinfección de superficies en contacto con alimentos y eliminación de bacterias patógenas que pueden estar presentes en los alimentos, sin embargo la presencia de bacterias deterioradoras como *L. mesenteroides*, puede reducir drásticamente la vida de anaquel de productos cárnicos curados cocidos como son las salchichas, ocasionando grandes pérdidas económicas, algunas de las características específicas de las BAL es que sobreviven el proceso de cocción de los productos cárnicos que puede ser hasta 80°C, son microaerófilas, por lo que pueden crecer en empaques al vacío y en presencia de antimicrobianos utilizados en la industria cárnica, con todos estos atributos de las bacterias ácido lácticas, es relevante buscar alternativas de control, con el fin de incrementar la vida útil de los productos cárnicos. El objetivo de este trabajo fue aislar, a partir de varios puntos de una planta procesadora de embutidos y una planta tratadora de agua residual, bacteriófagos líticos de bacterias deterioradoras de embutidos envasados al vacío (*L. mesenteroides*) proveniente de superficies, equipo de la planta procesadora, ingredientes y producto terminado con características de deterioro.

Metodología

Aislamiento de *L. mesenteroides*

El aislamiento de *L. mesenteroides*, se realizó a partir de muestras tomadas de superficies (paredes y piso); de pasta de salchicha y de producto terminado procedentes de dos empresas productoras de salchichas de la ciudad de Guadalajara, Jalisco. Las muestras de superficie y de pasta de salchicha fueron procesadas el mismo día, en el caso del producto terminado se formaron paquetes de salchichas de 500 g, los cuales se almacenaron a 12°C hasta que presentaron signos de deterioro, 15 días después de su fecha de caducidad. Para el análisis de todas las muestras se utilizó la técnica de diluciones decimales y siembra en placa en agar preparado con caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) y 1.5% de agar. El aislamiento se realizó mediante resiembras sucesivas por el método de estría cruzada, seleccionando aleatoriamente, colonias con las características morfológicas propias de las BAL. La identificación de las BAL se llevó a cabo mediante observación de morfología colonial, pruebas bioquímicas (tinción de Gram y prueba de catalasa) y mediante espectrometría de masas de desorción/ionización con láser asistida (MALDI-TOF MS) (Bruker-Daltonics), consultando en la biblioteca de referencia BioTyper. Los resultados de identificación fueron expresados por registro (puntajes) de BioTyper que indicaron la similitud del perfil de MALDI-TOF desconocido con las

entradas de la base de datos disponible. El registro de BioTyper y puntuación final se calculó como un logaritmo de la puntuación obtenida [4].

Aislamiento de bacteriófagos líticos asociados a *L. mesenteroides*

En la toma de muestra para el aislamiento de bacteriófagos líticos se llevó a cabo una visita a una empacadora de embutidos, ubicada en la ciudad de Guadalajara Jalisco, con el objetivo de tomar muestras de diversos lugares para el aislamiento de bacteriófagos de bacterias lácticas deterioradoras, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Codificación de muestras de distintos sitios para el aislamiento de bacteriófagos empleando como cepa huésped a *L. mesenteroides*.

Código de muestra	Descripción del lugar de muestreo
M1	Pasta de salchicha tomada de la superficie del homogeneizador
M2	Pasta de ave (ingrediente)
M3	Superficie de picadora carne de ave
M4	Agua a la salida del horno
M5	Agua a la salida de la embutidora
M6	Cajas de almacenamiento antes de envasar
M7	Agua de lavado de las salchichas antes de envasar
M8	Agua de la planta de tratamiento agua residual de la Unidad Zapopan del CIATEJ

Haciendo uso de material estéril (jeringas, cucharas y bolsas estériles), se tomaron muestras, de diferentes puntos de la planta como superficies de equipos, agua de lavado de estos, ingredientes y producto en proceso, conformando un total de ocho muestras (Tabla 1). Todas las muestras se almacenaron en cadena de frío hasta su análisis, realizado el mismo día. Para este ensayo, también se trabajó con una muestra de agua residual de 1 L, tomada antes de la entrada a la planta de tratamiento de aguas residuales de la unidad Zapopan del CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco). Para las muestras líquidas, se utilizaron jeringas estériles y se conservaron en una hielera.

El aislamiento de bacteriófagos líticos, se utilizó como huésped una cepa nativa de *Leuconostoc mesenteroides*, procedente de producto terminado con características de deterioro, se realizó un enriquecimiento en caldo MRS doble concentración de medio de cultivo (110 g L^{-1}) con $100 \mu\text{L}$ de cepa huésped (*L. mesenteroides*), con crecimiento de una noche, se incubó durante 4 a 6 h; luego se añadieron 30 g de muestra para las muestras sólidas o 30 mL para las muestras líquidas. Posteriormente, se incubaron a 32°C durante una noche en un agitador orbital a 28 rpm (LSI-3016A, LabTech, Alemania). Esto se repitió con cada una de las 8 muestras recolectadas. Posteriormente esta mezcla se centrifugó $10000\times g$ durante 10 min en una centrífuga Heraeus multifuge X3R, rotor Fiberlite F15-8x50c, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts; se filtró el sobrenadante con un filtro desechable de polipropileno con un tamaño de poro de $0.22 \mu\text{m}$. Al filtrado obtenido, se le denominó filtrado enriquecido.

Para probar la presencia de bacteriófagos en el filtrado enriquecido se utilizó el método de doble capa de agar MRS. Esta doble capa se formuló añadiendo 1 mL del filtrado enriquecido y $400 \mu\text{L}$ de *L. mesenteroides* con 6 h de crecimiento, estos se añadieron a 3 mL de agar MRS fundido a 48°C (0.6% de agar). Esta mezcla de filtrado, agar y huésped, se colocó en la superficie de placas de agar sólido MRS (1.5% agar), las placas de bacteriófagos se evaluaron después de una noche de incubación a 32°C [5]; una vez obtenidos los bacteriófagos se prepararon stocks de 1 mL de virus puros al cual se le llamo lisado crudo, se procedió a escalarlo con el objetivo de incrementar la concentración y volúmenes de esos de bacteriófagos.

A partir de los stocks de 1 mL, mencionados en el párrafo anterior, se tomaron $100 \mu\text{L}$ del stock que fueron inoculados a un tubo (1.5 mL) con $800 \mu\text{L}$ de caldo MRS y $100 \mu\text{L}$ de un cultivo de bacteria huésped con crecimiento de 6 h. Posteriormente, esta mezcla se incubó a 32°C por 24 h, manteniendo el microtubo protegido de la luz. Posteriormente se centrifugó a $10000\times g$ por 3 min, se recuperó el sobrenadante y se procedió a obtener el título, mediante prueba por goteo. Enseguida este sobrenadante se inoculó a un tubo con 4 mL de caldo MRS y 1 mL de cultivo de *L. mesenteroides* con crecimiento de 6 h, se incubó a 32°C por

una noche. A continuación se centrifugó a $10000\times g$ por 3 min (Heraeus Fresco 17 Refrigerated Micro Centrifuge, 24-PI Rotor, Thermo Scientific, USA), se recuperó el sobrenadante y se procedió a obtener el título mediante prueba por goteo, posteriormente este sobrenadante se inoculó a un tubo con 40 mL de caldo MRS y 5 mL de cultivo bacteriano de 6h, se incubó a 32°C por una noche, después se centrifugó a $10000\times g$ por 3 min, se obtuvo el título, mediante prueba por goteo y se procedió a filtrar en membrana de $0.22\ \mu\text{m}$ (con una jeringa estéril de 50 mL), este lisado crudo se conservó a 4°C protegido de la luz.

Para conocer el título o concentración del lisado crudo (cantidad de bacteriófagos presentes) en los enriquecimientos obtenidos, se procedió a realizar, en una microplaca, diluciones decimales seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-8} utilizando como diluyente buffer SM (Tris-HCl 0.05 M; NaCl 0.1 M; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%; gelatina 0.01%), sobre una doble placa de agar con la bacteria huésped con crecimiento de 6 h. Para determinar el título del enriquecimiento, se contó el número de calvas placas de lisis presentes en la última dilución donde estas se encuentren entre 3 a 30 [5].

Se tomaron 200 μL de lisado crudo y mezclaron con 200 μL de cultivo bacteriano de 6 h y 600 μL de caldo MRS, para completar 1 mL. Posteriormente se incubaron por 2 h para llevar a cabo una preinfección y se transfirieron a criotubos (Corning) con 500 μL de glicerol estéril (Thermo scientific) y se conservaron a -80°C y otros a -20°C .

La prueba de gota (spot test) para evaluación de bacteriófagos fue realizada de la manera siguiente: la gama de hospederos de los lisados crudos obtenidos probando sobre los 60 aislamientos identificados como *L. mesenteroides* provenientes de paquetes de salchichas Viena deterioradas. Un resultado positivo en la prueba de la gota se evidencia por la presencia de halos claros de inhibición bacteriana (Figura 1).

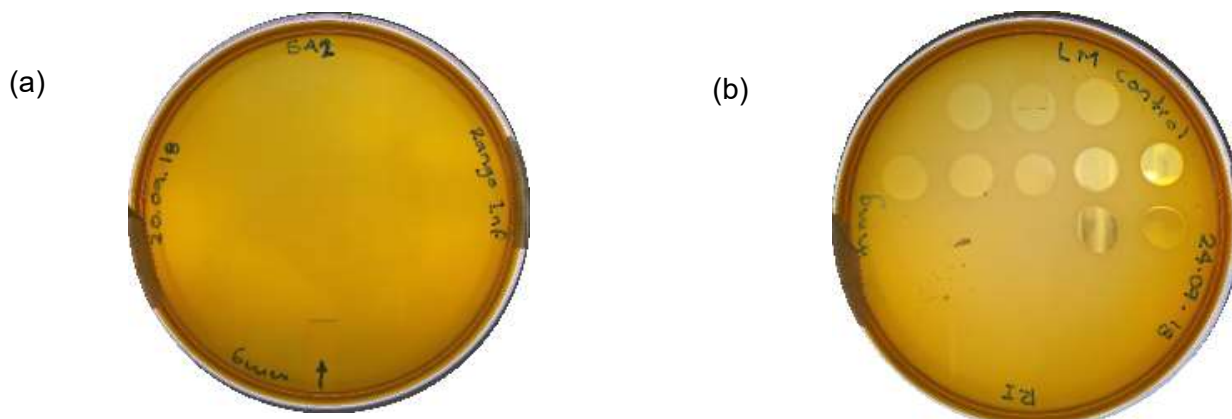


Figura 1. Prueba de la gota también conocido como “spot test”, para determinar la gama de infección del bacteriófago en distintas especies o cepas de una especie de las BAL. (a) muestra un resultado negativo para la prueba de la gota. (b) muestra un resultado positivo para la prueba.

La preparación de esta prueba de la gota se realizó en una placa doble placa de agar donde fueron probados los lisados crudos de bacteriófagos. La doble placa de agar se formuló mezclando 400 μL de cultivo bacteriano de 6 h huésped *L. mesenteroides* y 3 mL de agar MRS suave (agar 0.6%) fundido a 52°C en un tubo de ensaye. Posteriormente este se vertió sobre una placa de agar MRS sólido, distribuyendo uniformemente sobre esta con movimientos circulares evitando la formación de burbujas, para después dejar solidificar a temperatura ambiente por un tiempo de 30 a 40 min. Una vez que las placas solidificaron, se procedió a colocar gotas de 3 μL de cada uno de los lisados crudos de bacteriófagos, sobre cada una de las placas que contenían un césped bacteria huésped. Posteriormente las placas se incubaron a 32°C por 24 h.

Resultados y discusión

En el aislamiento de BAL a partir de muestras de salchichas y planta procesadora, se seleccionaron 165 aislamientos con características propias de las BAL. De los cuales se lograron identificar 121 aislados, a nivel de género y especie, mediante equipo MALDI-TOF. Fue posible identificar como *L. mesenteroides*, 60 de estos aislamientos provenientes de paquetes de salchicha Viena deteriorados, lo que de acuerdo con lo que

reporta la bibliografía, la ubica como bacteria deterioradora de este tipo de productos [6, 7]. Los demás aislamientos correspondieron a otras especies BAL.

Respecto al aislamiento de bacteriófagos, estos son entes biológicos ubicuos y su presencia está estrechamente ligada a la de sus huéspedes. Además, de acuerdo con los resultados encontrados, también fue posible aislar bacteriófagos de materia prima y superficies de equipos; tal como lo reporta Korkeala en 1997 [3], hay presencia de BAL sobre los equipos de procesamiento. La presencia de bacteriófagos se evidencia, debido a la aparición de zonas claras denominadas placas de lisis de aproximadamente 1 mm de diámetro (Figura 2), en las placas elaboradas con el lisado crudo de bacteriófago correspondiente a dos (agua residual y cajas de almacenamiento) de las ocho muestras analizadas. A partir de estas placas, se formularon un total de 7 enriquecimientos (dos procedentes de cajas de almacenamiento y cinco procedentes de agua residual) potencialmente distintos bacteriófagos, los cuales fueron probados contra las 60 cepas de *L. mesenteroides*, de las cuales solo se logró encontrar actividad lítica en tres cepas de las 60 (Tabla 2).

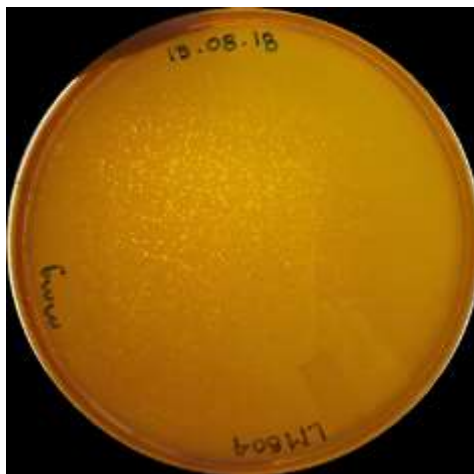


Figura 2. Placas de lisis originadas de la interacción entre un bacteriófago y su cepa bacteriana huésped. Nótese los puntos claros en la placa denominados placas de lisis o calvas, lo cual es originado por la acción de bacteriófagos.

Tabla 2. Resultados positivos de la evaluación de la gama de hospederos para los diferentes bacteriófagos aislados. Se muestran solamente las tres *Leuconostoc mesenteroides* que presentaron un resultado positivo, de las 60 que se probaron.

Cepa	Bacteria ácido láctica	Bacteriófago aislado						
		LM601	LM603	LM801	LM802	LM803	LM803a	LM804
44	<i>L. mesenteroides</i>	-	-	+	-	-	-	-
48	<i>L. mesenteroides</i>	-	+	-	-	-	+	+
65	<i>L. mesenteroides</i>	-	-	-	-	-	+	+

- Placas de lisis claras lo cual sugiere bacteriófagos lítico.

+ Placas de lisis opacas lo cual sugiere bacteriófagos lisogénicos.

Conclusiones

En este trabajo se aislaron BAL de diversos puntos de la planta procesadora de productos cárnicos y de producto terminado deteriorado. Las cuales se logró identificar a nivel de género y especie, mediante morfología colonial y espectrometría de masas mediante equipo MALDI-TOF-MS. Dos de las especies de BAL aisladas *Leuconostoc mesenteroides*, han sido reportadas como bacterias deterioradoras; las cuales se lograron aislar en diversos puntos de las plantas procesadoras estudiadas, como suelos, paredes y superficies de equipos, así como también de producto en proceso y producto terminado, además se aislaron otras

bacterias presentes en salchichas deterioradas. A pesar de que la presencia de bacteriófagos está ligada a la presencia de bacterias, no se logró aislar bacteriófagos líticos en el origen de las BAL aisladas (equipos, superficies y producto); sin embargo, se aislaron diversos bacteriófagos líticos a partir de una muestra de agua residual. Este aislamiento de bacteriófagos demostró que, en el agua residual, existen las mismas BAL que en la planta procesadora y en producto terminado. Se logró relacionar la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* aislada en planta y producto terminado con sus respectivos bacteriófagos aislados de agua residual. El rango de hospederos de los bacteriófagos aislados en este estudio, en general es limitado sobre todo para los aislados en planta procesadora, sin embargo, los bacteriófagos aislados de agua residual presentaron rangos de infección más amplios, esto puede deberse debido al origen de estos virus.

Agradecimientos

Martínez-García, M. agradece al CONACyT por la beca otorgada para estudios de posgrado. Este proyecto fue apoyado para su realización por distintos proyectos de investigación de los Laboratorios de Fitopatología y de Microbiología de Alimentos del CIATEJ.

Referencias

- [1] Stiftung B.H. (2019). "No Title", *Lo que no te comes, nos hace daño a todos*. Consultado: 15 septiembre 2020. <https://mx.boell.org/es/2019/05/15/lo-que-no-te-comes-nos-hace-dano-todos>.
- [2] Lulietto M.F., Sechi P., Borgogni E., Cenci-Goga B.T. (2016). Meat spoilage: a critical review of a neglected alteration due to ropy slime producing bacteria. *Italian Journal of Animal Science* **14**:3, 4011, DOI: 10.4081/ijas.2015.4011.
- [3] Korkeala H. (1997). Microbiological spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages. *J. Food Prot.* **60**: 724-731.
- [4] Dušková M., Šedo O., Kšicová K., Zdráhal Z., Karpíšková R. (2012). Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *Int. J. Food Microbiol* **159**(2): 107-114. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.029.
- [5] Clokie A., Kropinski M. (2018). *Bacteriophages: Methods and Protocols*. Ontario, Canada.
- [6] John Samelis J.K.A.R. (2000). Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 degrees C. *Food Microbiology* **17**(3): 329-340. doi: 10.1006/fmic.1999.0316.
- [7] Von H.T.E., Dykes G.A., Cloete T.E. (1991). Quantification of microbial populations associated with the manufacture of vacuum-packaged, smoked Vienna sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **13**: 239-248.