



Año
XXV
111

Tecnología Láctea®

L A T I N O A M E R I C A N A

■ Probióticos ■ Mercado mundial ■ Fepale ■ Plan brucelosis ■ Antioxidantes ■ Fagos ■

ISSN 0328-4158

www.publitec.com

desinmec

Representante de
YASKAWA
MOTOMAN STRATEGIC PARTNER

ISO 9001
BUREAU VERITAS
Certification



sinergia

POR UN MUNDO SUSTENTABLE



Hecho con
Energías
Renovables
en Santa Fe



Soluciones de Envasado y Empaque



ALIMENTOS



LÁCTEOS



FRIGORÍFICA



FARMACÉUTICA



COSMÉTICA



AGROQUÍMICA



QUÍMICA

📍 Ruta Prov. N°6 Km. 27,7 | (3017) San Carlos Sud - Santa Fe | 📞 +54 - 3404 - 420785 / 423185 | 📠 +54 - 9 - 3404 - 523895

✉ desinmec@desinmec.com | 🌐 www.desinmec.com

SUMARIO

INGREDIENTES



4 Probióticos: datos, tendencias y oportunidades en la industria de alimentos y bebidas

Artículo elaborado en base a material de Chr. Hansen: “Probiotics in Dairy – White paper 2019” y “Ha-La Biotec en Español N° 1 – Septiembre 2020”

Los consumidores de todo el mundo están adoptando enfoques preventivos para mantener una vida más saludable. De esta manera, ha crecido el interés en las dietas ricas en alimentos funcionales que también satisfagan la demanda de productos naturales de mejor calidad.

EMPRESAS



10 Granotec
Agar-Agar, la versatilidad de un ingrediente en expansión

14 Merck
Sistema de rt-PCR Assurance GDS® en la detección de *E.coli* enterohemorrágicas en carnes y vegetales

16 Pall Food and Beverage
Sistema GeneDisc®. Detección rápida y confiable de contaminantes



MERCADOS

18 Mercado mundial de lácteos, tendencias emergentes y perspectivas
Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)

INSTITUCIONES

30 FEPALE eligió Presidente y autoridades de la Federación
El chileno Eduardo Schwerter Añazco presidirá FEPALE por los próximos dos años

INOCUIDAD



32 Impacto del nuevo plan de control y erradicación de brucelosis bovina en su primer año de ejecución en la Cuenca Lechera de Trancas, Tucumán

Aráoz J.; Cruz M.L.; Martínez G.C.; Cordileone G.B.; Jorrat J.J.; de la Vega A.C.

44 Evaluación de un cóctel de seis bacteriofagos líticos contra *Escherichia coli* productora de toxina Shiga en leche y carne

David Tomat, Cecilia Casabonne, Virginia Aquili, Claudia Balagué, Andrea Quiberoni

NUTRICIÓN Y SALUD



36 Evaluación in vitro de las propiedades antioxidantes en leches fermentadas con jugo de frutilla y frambuesa

Carolina Manno, Roxana Beatriz Medina, Emilia Latorre, Analía Inés Etcheverría, Guillermo Manrique y María Fernanda Vega

ÍNDICE DE ANUNCIANTES

ALPHA QUÍMICA	35	HIDROBIOT	35
ASEMA	15	ING. LÓPEZ	26
BIACONSULT	1	KUAL	21
BUSCH	27	LÓPEZ INGENIERÍA	31
CHR. HANSEN	RCT	SIMES	29
DESINMEC	T	SIPEA	13
FITHEP LATAM	CT	TAV INGENIERÍA	33
FRÍO RAF	29	TESTO	9

STAFF DICIEMBRE 2020

DIRECTOR

Néstor E. Galibert

DIRECTORA EDITORIAL:

Prof. Ana María Galibert

RELAC. INTERNAC.:

M. Cristina Galibert

DIRECCIÓN TÉCNICA:

M.V. Néstor Galibert (h)

DIRECCIÓN, REDACCIÓN Y ADM.

Av. Honorio Pueyrredón 550 - Piso 1 (1405) CABA - ARGENTINA

Tel.: 54-11-6009-3067

info@publitec.com.ar

http://www.publitec.com.ar

C.U.I.T. N° 30-51955403-4

Esta revista es propiedad de Publitec S.A.E.C.Y.M.

Propiedad Intelectual: 47937323

IMPRESIÓN

GRÁFICA PINTER S.A.

Diógenes Taborda 48/50 (C1437EFB)

C.A.B.A. / Tel./Fax: (54-11) 4911-1661

graficapinter@graficapinter.com.ar

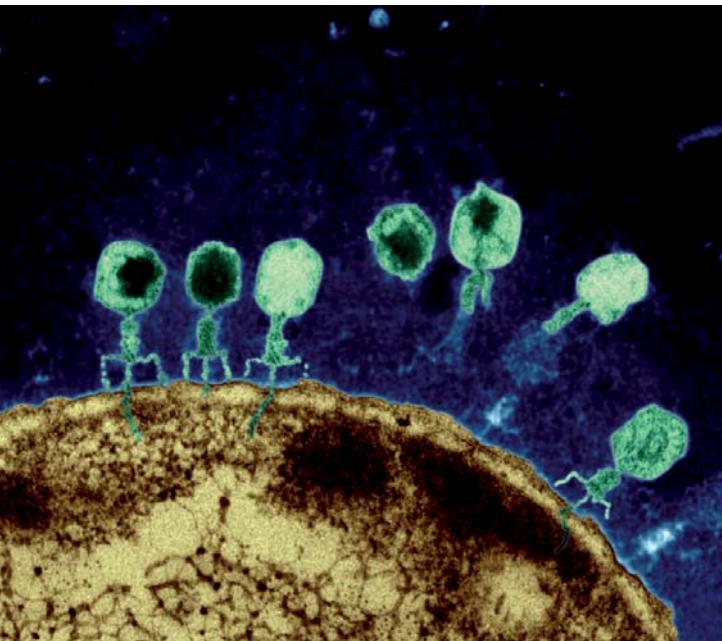
Visite nuestras revistas on-line:

www.publitec.com.ar

Publitec es miembro



Evaluación de un cóctel de seis bacteriofagos líticos contra *Escherichia coli* productora de toxina Shiga en leche y carne



David Tomat^{1*}, Cecilia Casabonne¹, Virginia Aquili¹, Claudia Balagué¹, Andrea Quiberoni²

¹Área de Bacteriología - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina.

²Instituto de Lactología Industrial (UNL - CONICET) - Facultad de Ingeniería Química. Santa Fe, Argentina. dtomat@fbioyf.unr.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los patógenos de origen alimentario como las cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* (EPEC) y Shiga-toxigénicas de *Escherichia coli* (STEC) son las principales causas de diarrea y síndrome urémico hemolítico (SUH) en nuestro país (Rivas y col., 2008). Las infecciones por STEC se transmiten a los humanos a través de alimentos contaminados como la carne (Rivas y col., 2003), la leche (Farrokh y col., 2013) y el agua (Swerdlow y col., 1992), mientras que la infección por EPEC está relacionada con la contaminación fecal debido a la manipulación antihigiénica de los alimentos (Hernandes y col., 2009).

El uso de bacteriófagos como agentes de control biológico es una alternativa prometedora contra varios patógenos transmitidos por los alimentos (O'Flynn y col., 2004; O'Flaherty y col., 2005;

Bigwood y col., 2008; Mukhopadhyay y Ramaswamy, 2012). Los fagos son muy activos y específicos, y se han utilizado de forma extensa y segura en aplicaciones clínicas en Europa (García y col., 2008). Además, los fagos tienen un uso muy versátil a lo largo de la cadena alimentaria, ya que se han empleado para terapia, biosanización y biopreservación (Modi y col., 2001; Gill y col., 2006; Raya y col., 2006; Kim y col. 2007). El uso de cócteles de fagos para controlar patógenos transmitidos por los alimentos se ha explorado en la leche (García y col., 2007; Zuber y col., 2008), carne (O'Flynn y col., 2004), frutas y verduras (Leverentz y col., 2003; Viazis y col., 2011). Las preparaciones compuestas por varios fagos que utilizan diferentes receptores en las bacterias diana pueden tener la ventaja de infectar un mutante resistente a otro fago presente en el cóctel.

Las bacterias pueden mostrar resistencia a varios antibióticos (Yilmaz y Ozcengiz, 2017). Además, el uso de antibióticos como aditivos en los alimentos para animales, también conocidos como antibióticos promotores del crecimiento (GPA), podría propagar la resistencia entre las bacterias (Jia y col., 2017). A diferencia de los fagos, los antibióticos pueden seleccionar muchas especies bacteria-

nas resistentes debido a su amplio espectro de acción. Los mecanismos de resistencia bacteriana contra los fagos y los antibióticos difieren (Sulakvelidze y Barrow, 2005). Por lo tanto, los fagos podrían usarse como un obstáculo adicional, contribuyendo a reducir la incidencia de resistencia bacteriana a varios antibióticos actualmente empleados. Estos cócteles han demostrado su eficacia contra varios patógenos como *Staphylococcus aureus* (García y col., 2007) y *Enterobacter sakazakii* (Zuber y col., 2008) en productos lácteos. Sin embargo, su eficacia contra *E. coli* en la leche (McLean y col., 2013) como en productos cárnicos a temperatura de refrigeración (Abuladze y col., 2008), ambiente y abusiva (O'Flynn y col. 2004) ha sido escasamente explorada. En nuestro estudio, los fagos se proponen como herramientas para ser utilizadas en combinación y/o alternancia con otras tecnologías actuales. Así, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la utilidad potencial de seis fagos mezclados en un cóctel para controlar cepas de *E. coli* probando su eficacia en diferentes condiciones en leche y productos cárnicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y fagos

Se utilizó *E. coli* DH5 α como la cepa huésped sensible para propagar todos los bacteriófagos utilizados en este estudio. Se utilizaron tres cepas adicionales en los experimentos de biocontrol. Dos de ellas, una *E. coli* enteropatógena (eae+) (EPEC) y una *E. coli* Shigatoxigénica O157:H7 (stx2+ y eae+) (STEC O157), fueron previamente aisladas de muestras de heces (coprocultivos), identificadas mediante el sistema API-20E (Biomerieux, Buenos Aires, Argentina) y caracterizadas por PCR. La tercera cepa utilizada fue *E. coli* no-O157:H7 Shigatoxigénica (ARG4827; serogrupo O18; stx1+ y stx2+) (STEC no-O157) (Balague y col., 2006).

Los bacteriófagos (*Myoviridae*; tipo T-even) (Tomat y col., 2013a), DT1 a DT6, fueron previamente aislados de muestras de heces de pacientes con diarrea tratados en el Hospital Centenario, Rosario (Tomat y col., 2013b) y caracterizados por microscopía electrónica, por su rango de hospedador y ensayos de PCR (Tomat y col., 2013a). Los fagos se propagaron a títulos altos como se describió anteriormente (Tomat y col., 2013b) y se enumeraron (unidades

formadoras de placa por mililitro; UFP/mL) mediante el método de titulación en placa de doble capa (Jamalludeen y col., 2007). Los stocks fágicos se almacenaron en buffer Tris-magnesio-gelatina (0,05 mol/L de Tris, 0,008 mol/L de MgSO₄, 0,01% p/v de gelatina, pH = 7,5) (TMG) a 4°C.

Estudios de biocontrol

Biocontrol en leche. Los experimentos de biocontrol se realizaron a 4°C, 24°C y 37°C en lotes paralelos en leche desnatada en polvo (RSM) estéril, comercial, reconstituida (10%, p/v) (pH 6,7), adicionada con CaCl₂ (0,28 g/L) para reemplazar la pérdida durante la esterilización de la leche. Todos los lotes se inocularon (excepto uno; control de contaminación) con cultivos crecidos over night de las cuatro cepas de *E. coli* ensayadas (DH5 α , EPEC, STEC no-O157 y STEC O157) (una cepa por lote; concentración final ~10³-10⁴ UFC/mL; ensayos de control) descriptas anteriormente. A continuación, los lotes se dividen en dos alícuotas, se inoculó una alícuota de cada lote infectado con cada cepa de *E. coli* con el cóctel de fagos (~10⁸ - 10⁹ UFP/mL; ensayos experimentales) para evaluar su potencial como agentes de control biológico, obteniendo una multiplicidad de infección (MOI) que varía de ~10⁴ a 10⁶. La alícuota restante se utilizó como control. La incubación se llevó a cabo durante 24 h a 24°C y 37°C y durante seis (6) días a 4°C. Durante la incubación se realizaron recuentos de células bacterianas en agar MacConkey (37°C, 18 h) y se llevaron a cabo la cuantificación de los fagos mediante el método de titulación en placa de doble capa (descrito anteriormente) al comienzo y al final de cada experimento. Al finalizar los ensayos con leche, se evaluó la resistencia de diez colonias seleccionadas al azar aisladas de los experimentos (bacterias expuestas a fagos) frente al cóctel de fagos. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y dos réplicas por ensayo.

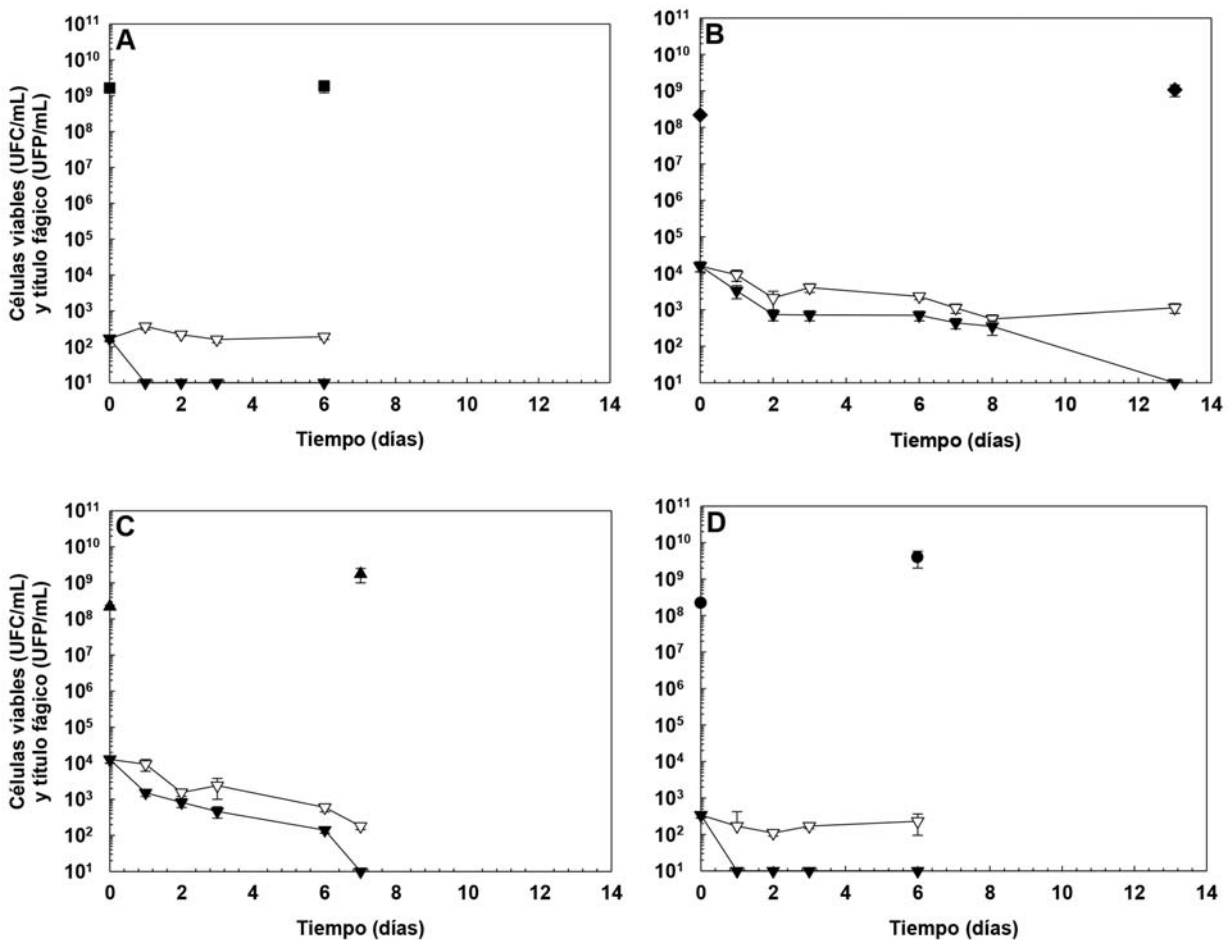
Biocontrol en carne. Carne de origen bovino se cortó asepticamente en trozos (1 cm² de superficie y 0,4 cm de espesor; pH 5,6), se colocó en placas de Petri y se pre-equilibró a 4°C, 24°C o 37°C. Las cepas hospedadoras empleadas en este estudio, a saber, DH5 α , EPEC, STEC no-O157 y STEC O157, se crecien-

INOCUIDAD

ron en caldo Hershey-Mg durante 18 h a 37°C. Se inocularon 20 µL de cada suspensión bacteriana diluida sobre la superficie de la muestra de carne (una cepa por muestra; concentración final ~10³-10⁴ UFC; ensayos de control) y se dejó adherir durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se pipetearon 20 µL del cóctel de fagos (compuesto por seis fagos: DT1 a DT6 en proporciones iguales) en la carne (concentración final ~10⁸-10⁹ PFU; ensayos experimentales) a una MOI alta (~10⁵ UFP/UFC). Los controles se inocularon con 20 µL de buffer TMG en lugar del cóctel de fagos. Los controles y tratamientos se incubaron a 4°C, 24°C o 37°C. Después de cada tiempo de incubación, los trozos de carne se transfirieron a una bolsa estéril, se agitaron 5 mL de buffer TMG

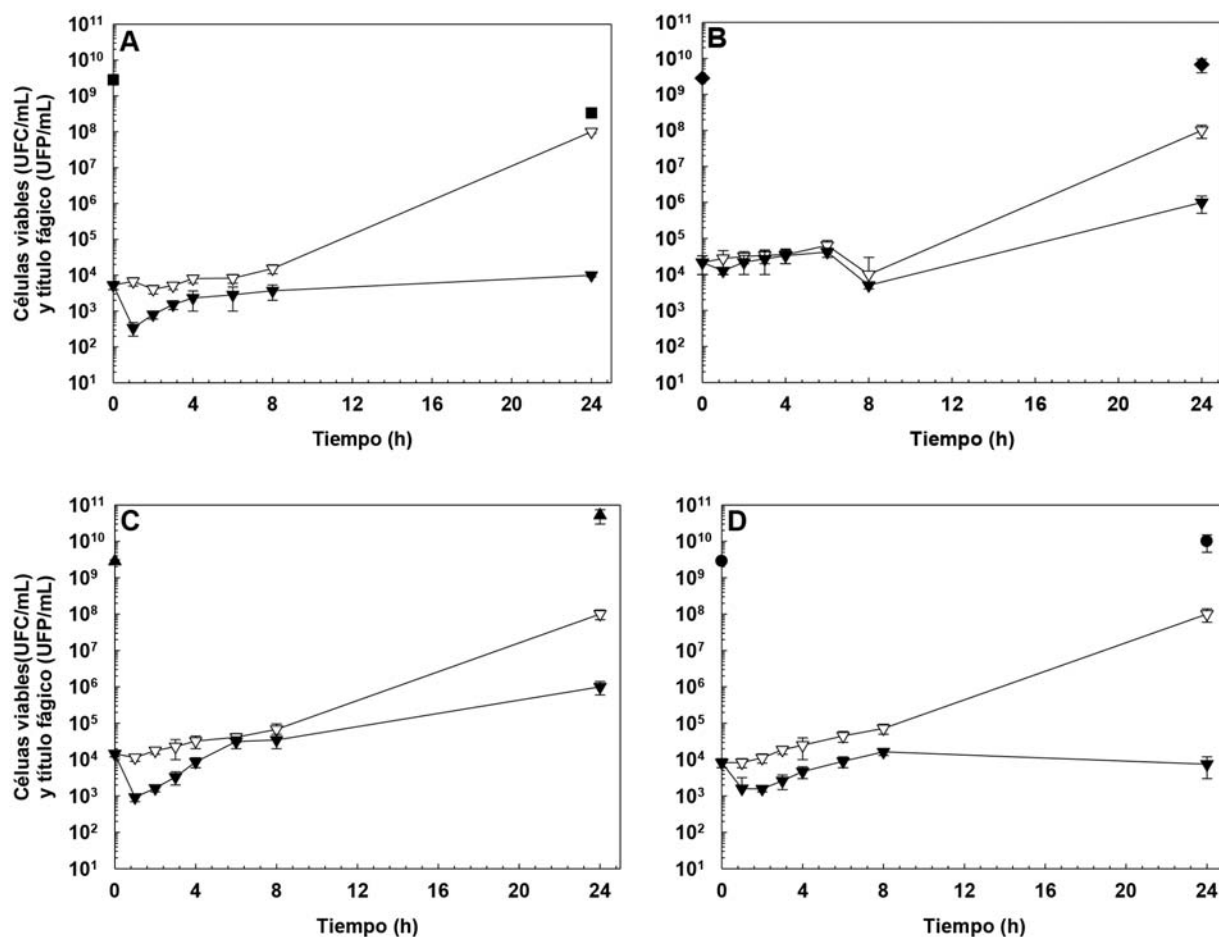
y las muestras se procesaron durante 2 min en un Stomacher (Seward, Londres, Reino Unido). Se transfirió una porción (1 mL) del fluido del stomacher a un tubo estéril y las células se sedimentaron mediante centrifugación a 3000 x g durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 mL de buffer TMG. Finalmente, se tomó una muestra (0,1 mL), se diluyó en serie (si era necesario) en buffer TMG y se sembraron 0,1 mL de cada dilución en agar MacConkey para la enumeración de células viables (Bigwood y col., 2008). Los fagos se enumeraron mediante el método de titulación en placa de doble capa (Jamalludeen y col., 2007) al principio y al final de cada experimento. Se evaluaron controles sin inocular para determinar la presen-

Figura 1 - Inactivación de *Escherichia coli* DH5α (A), EPEC (B), STEC no-O157 (C) y STEC O157:H7 (D) por el cóctel de seis fagos en leche a 4°C



Símbolos llenos (●) representa conteo de células viables en presencia de fagos y símbolos vacíos (▽) son controles libres de fagos. Título fágico al inicio (0 d) y al final de cada experimento con DH5α (●; 6 d), EPEC (◆; 13 d), STEC no-O157 (▲; 7 d) y STEC O157:H7 (●; 6 d). Barras de error representan el desvío estándar de tres determinaciones (p < 0,05).

Figura 2 - Inactivación de *Escherichia coli* DH5 α (A), EPEC (B), STEC no-O157 (C) y STEC O157:H7 (D) por el cóctel de seis fagos en leche a 24°C



Símbolos llenos (▼) representa conteo de células viables en presencia de fagos y símbolos vacíos (▽) son controles libres de fagos. Título fágico al inicio (0 d) y al final (24 h) de cada experimento con DH5 α (+), EPEC (◆), STEC no-O157 (▲) y STEC O157:H7 (●). Barras de error representan el desvío estándar de tres determinaciones ($p < 0,05$).

cia de bacteriófagos naturales. Después de los ensayos en carne, se comprobó la resistencia en diez colonias seleccionadas al azar aisladas de los experimentos (expuestas a fagos) contra el cóctel. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y dos réplicas por ensayo.

Análisis estadístico

Se compararon la media de dos muestras (tratamiento y control) utilizando la prueba t de student a $p < 0,05$ en cada tiempo de muestreo con tres observaciones ($n=3$; tres experimentos independientes) en cada grupo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

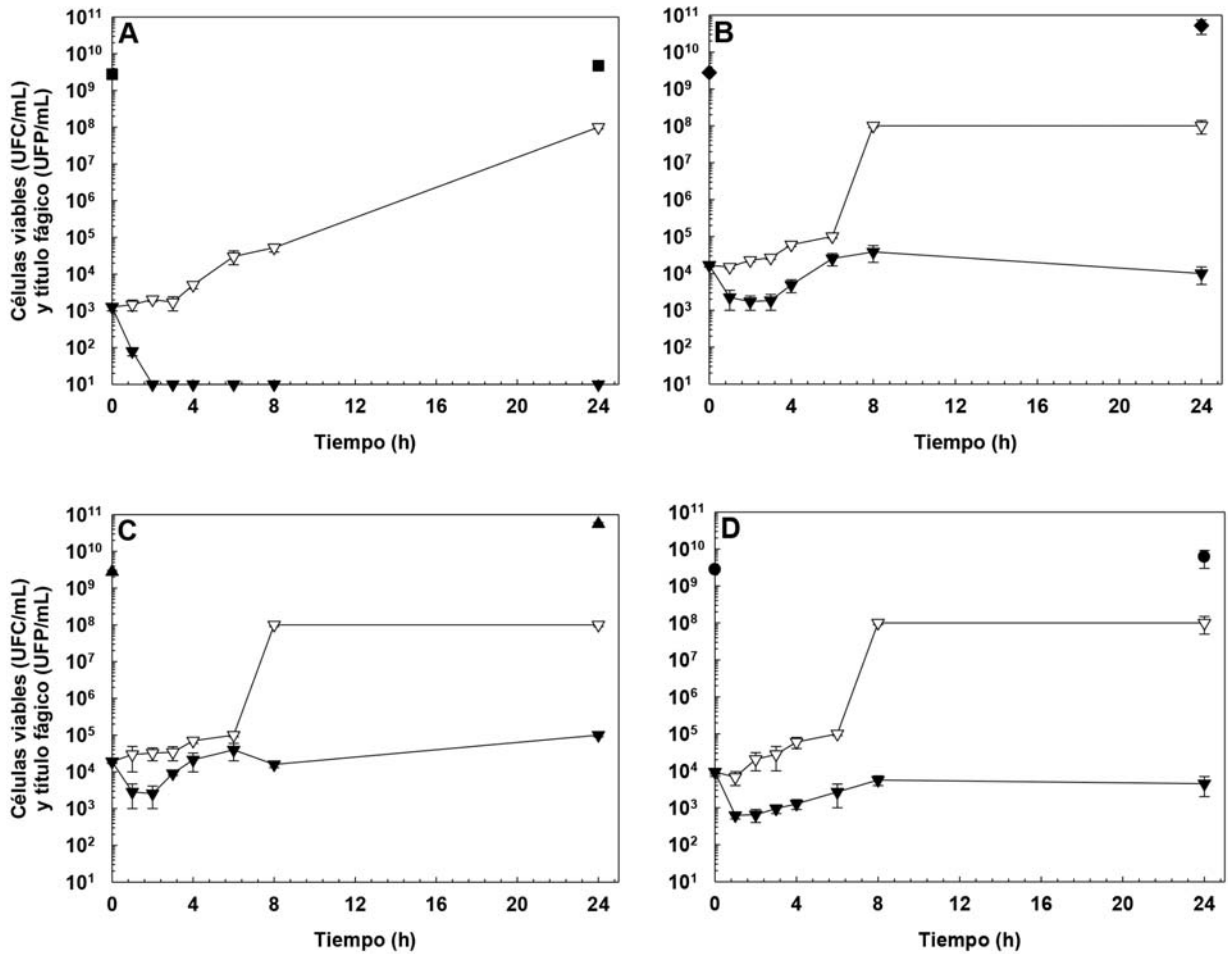
Biocontrol en leche

El cóctel de seis fagos se evaluó por su actividad lítica contra cepas no patógenas (DH5 α) y patógenas

(EPEC, STEC no-O157 y STEC O157:H7) en leche a temperatura de refrigeración (4°C), ambiente (24°C) y abusiva (37°C).

El nivel de contaminación de todas las cepas de *E. coli* ensayadas en leche estuvo por debajo del límite de detección ($<10^1$ UFC/mL) cuando se aplicó el cóctel de fagos a 4°C (Figura 1). Específicamente, los recuentos de células de DH5 α (Figura 1A) y STEC O157:H7 (Figura 1D) disminuyeron de $\sim 10^2$ UFC/mL por debajo del límite de detección después de una exposición de 1 día, mientras que las células de EPEC (Figura 1B) y STEC no-O157 (Figura 1C) fueron indetectables sólo después de 13 y 7 días de exposición al cóctel de fagos, respectivamente. A bajas temperaturas, también se observó una inactivación bacteriana similar empleando fagos en diferentes productos lácteos contra *E. coli* (McLean y col., 2013), *Enterobacter sakazakii* (Kim y col., 2007) y *Staphylococcus aureus*

Figura 3 - Inactivación de *Escherichia coli* DH5 α (A), EPEC (B), STEC no-O157 (C) y STEC O157:H7 (D) por el cóctel de seis fagos en leche a 37°C.



Símbolos llenos (▼) representa conteo de células viables en presencia de fagos y símbolos vacíos (▽) son controles libres de fagos. Título fágico al inicio (0 d) y al final (24 h) de cada experimento con DH5 α (•), EPEC (◆), STEC no-O157 (▲) y STEC O157:H7 (●). Barras de error representan el desvío estándar de tres determinaciones ($p < 0,05$).

(Bueno y col., 2012), especialmente cuando se usa un valor de MOI alto (Carlton y col., 2005).

Para determinar si los bacteriófagos pueden eliminar o inhibir el crecimiento de *E. coli* (~10⁴ UFC/mL) durante una interrupción de la cadena de frío, se realizaron ensayos con el cóctel en leche a temperatura ambiente (24°C) (Figura 2). Los recuentos de células en las muestras tratadas siempre estuvieron por debajo de los recuentos en los controles. Después de 24 h de incubación, las reducciones fueron ≥ 4 log₁₀ UFC para DH5 α (Figura 2A) y STEC O157:H7 (Figura 2D), mientras que sólo se observó una reducción de 2 log₁₀ CFU para EPEC (Figura 2B) y STEC no-O157 (Figura 2C).

Por lo tanto, el cóctel de fagos mantuvo la contaminación bacteriana a un nivel aceptable, similar a la contaminación inicial, para DH5 α y STEC O157:H7 después de 24 h, mientras que las cepas EPEC y STEC no-O157 se inhibieron sólo dentro de las 8 h de incubación. Se sabe que los cócteles de fagos utilizados con fines de biocontrol en productos lácteos son altamente efectivos contra *E. coli* (McLean y col., 2013), *Staphylococcus aureus* (Bueno y col., 2012) y *Mycobacterium smegmatis* (Endersen y col., 2013). Teniendo en cuenta que el nivel de contaminación por STEC en los productos lácteos es bajo (Omiccioli y col., 2009; Amagliani y col., 2016), y considerando que los alimentos altamente perecederos como la

leche (Likar y Jevsnik, 2006; Gunders, 2012) expuestos a temperatura ambiente durante un período de tiempo considerable deben desecharse, el cóctel de fagos demostró ser útil cuando la leche se somete a temperaturas no refrigeradas. Sin embargo, es posible que se necesiten herramientas adicionales para reducir significativamente o eliminar la contaminación bacteriana por *E. coli* en esta matriz a temperatura ambiente.

En los ensayos de biocontrol realizados en leche a 37°C (Figura 3), el cóctel de fagos redujo significativamente el recuento de EPEC (Figura 3B), STEC no-O157 (Figura 3C) y STEC O157:H7 (Figura 3D) en 4, 3 y 4 log₁₀ UFC/mL, respectivamente; aunque 10³-10⁴ células bacterianas permanecieron viables después de 24 h de incubación. Estos resultados son similares a los observados para otros patógenos como *Staphylococcus aureus* (García y col., 2007) y *Mycobacterium smegmatis* (Endersen y col., 2013) en productos lácteos tratados con un cóctel de fagos a 37°C. La cepa no patógena se redujo rápidamente cuando se expuso a nuestro cóctel, ya que los recuentos de DH5α estaban por debajo del límite de detección en 2 h (Figura 3A). De acuerdo con nuestros resultados, Moradpour y col. (2009) informaron de la inactivación completa de *E. coli* O157:H7 después de una exposición de 2 h cuando las células fueron enfrentadas a un fago modificado genéticamente (10⁹ UFP/mL) en leche a 37°C.

Con respecto a las células bacterianas que sobrevivieron en nuestros ensayos en leche después de una exposición de 24 h a 24°C y 37°C, otros autores

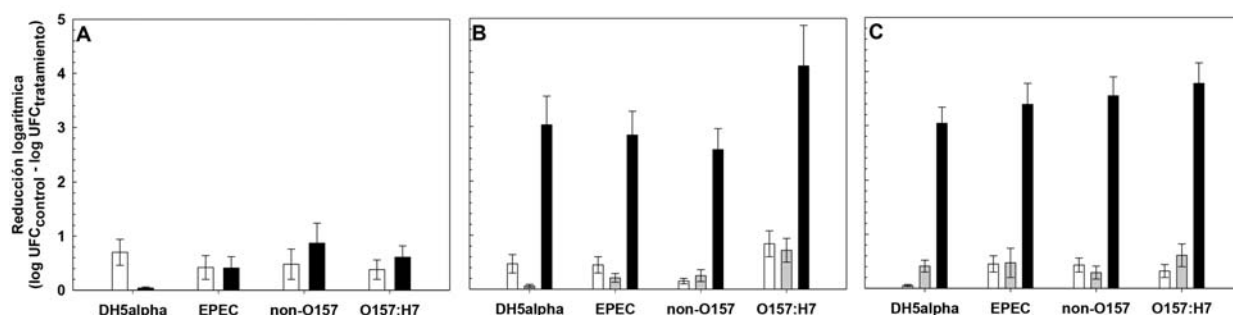
encontraron que algunas proteínas en el suero pueden inhibir la adsorción de fagos en bacterias (Gill y col., 2006). Además, en otro estudio se sugirió que el acceso del fago K a las células de *Staphylococcus aureus* estaba impedido por factores inmunes presentes en la leche bovina (O'Flaherty y col., 2005). A partir de los resultados obtenidos, planteamos la hipótesis de que puede haber un factor en la matriz láctea que está inactivo a baja temperatura pero que interfiere con los procesos de los fagos a temperatura ambiente y abusiva.

Ninguno de los diez aislados de *E. coli* recuperados de las muestras al final de los experimentos en leche demostró ser resistente a la infección por el cóctel de fagos (datos no mostrados). Se observó el desarrollo de mutantes para otros patógenos tratados con fagos (Endersen y col., 2013; Guenther y col., 2012), sin embargo, más de 30 aislamientos de *Listeria* conservaron la sensibilidad a la infección por P100 (Carlton y col., 2005). Los mutantes resistentes podrían surgir si se analiza un mayor número de colonias aisladas de nuestros experimentos en leche, especialmente con ensayos realizados a la temperatura de crecimiento óptima (37°C) para *E. coli* (O'Flynn y col., 2004).

Biocontrol en carne

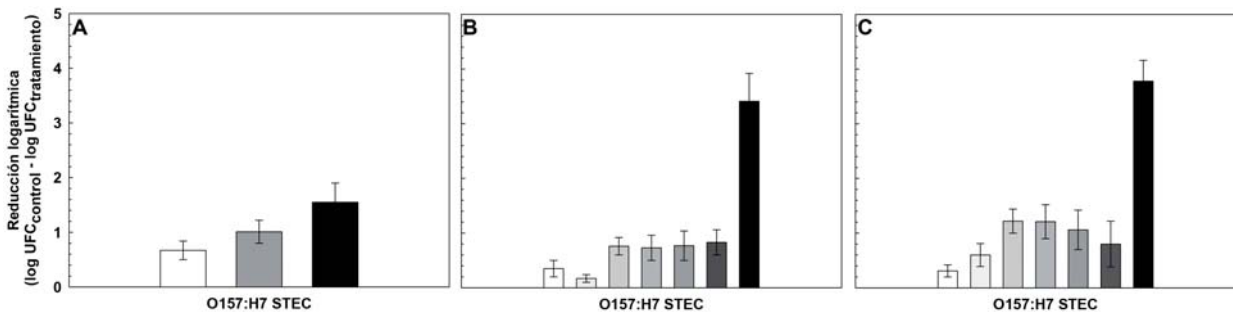
A continuación, se evaluó el potencial del cóctel para eliminar o reducir significativamente la contaminación bacteriana en carne. Para estos ensayos, los trozos de carne se inocularon con *E. coli* (~ 10³-10⁴ UFC) y con el cóctel (10⁹ UFP/ml). Posteriormente, las

Figura 4 - Reducción de células de *Escherichia coli* tratadas con el cóctel de seis fagos en carne luego de 24 h (barras blancas) y 48 h (barras negras) a 4°C (A), y luego de 1 h (barras blancas), 3 h (barras grises) y 24 h (barras negras) a 24°C (B) y 37°C (C)



Título fágico al inicio (0 h; ~ 1.2 x 10⁹ UFP/mL) y al final (24 h a 4°C; 48 h a 24°C y 37°C) de cada experimento fueron: DH5α (osciló entre 3,2 x 10⁶ a 1,5 x 10⁸ UFP/mL), EPEC (osciló entre 3,0 x 10⁶ a 1,9 x 10⁷ UFP/mL), STEC no-O157 (osciló entre 3,1 x 10⁶ a 2,8 x 10⁷ UFP/mL) y STEC O157:H7 (osciló entre 3,6 x 10⁶ a 3,6 x 10⁷ UFP/mL). Barras de error representan el desvío estándar de tres determinaciones (p<0,05).

Figura 5 - Reducción de células viables de STEC O157:H7 tratadas con el cóctel de seis fagos en carne luego de 1 d (barras blancas), 3 d (barra gris) y 6 d (barra negra) a 4°C (A), y luego de 1 h (□), 2 h (▨), 3 h (▩), 4 h (▪), 6 h (▬), 8 h (▮) and 24 h (■) a 24°C (B) y 37°C (C)



Título fágico al inicio (0 h; ~ 1,6 x 10⁸ UFP/mL a 24 y 37°C y 3,1 x 10⁹ UFP/mL a 4°C) y al final de cada experimento fue 1,4 x 10⁷ UFP/mL (4°C; 6 d), 2,0 x 10⁷ UFP/mL (24°C, 24 h) y 5,1 x 10⁷ UFP/mL (37°C, 24 h). Barras de error representan el desvío estándar de tres determinaciones (p < 0,05).

muestras de carne se incubaron a temperatura de refrigeración, ambiente y abusiva (Figura 4).

Cuando se aplicó el cóctel de seis fagos a la superficie de la carne, hubo una reducción pequeña pero significativa (0,5 a 1,0 log₁₀ UFC/mL) para todos los recuentos de células después de 24 h a 4°C, aunque se observó un recrecimiento bacteriano solo para DH5α después de una incubación de 48 h (Figura 4A). Varios estudios han demostrado la utilidad de la aplicación de fagos en la carne a baja temperatura (Carter y col., 2012; Hudson y col., 2013). Sin embargo, se han encontrado resultados variables para *E. coli* (Hudson y col., 2010; Hong y col., 2014) y para otros patógenos (Dykes y Moorhead, 2002; Bigwood y col., 2008). Aunque se usaron valores altos de MOI para aumentar el número de células que se infectan al comienzo de nuestro experimento, se observaron niveles bajos de inactivación. Esto podría deberse a la lisis celular durante el recuento (Hudson y col., 2013) o al hecho de que la mayoría de las bacterias blanco pueden estar “ocultas” dentro de la red de proteínas en la matriz de la carne, volviéndose inalcanzables para las partículas de fagos (Tomat y col., 2013a). Por el contrario, nuestro cóctel de fagos mostró mejores valores de biocontrol a temperaturas más altas. A 24°C (Figura 4B) y 37°C (Figura 4C), la reducción bacteriana aumentó con el tiempo en presencia de fagos en comparación con los controles sin fagos. En concordancia, O’Flynn y col. (2004) obtuvieron una inactivación completa de

E. coli en siete de nueve muestras de carne dentro de 1 h de incubación a 37°C mediante el uso de un cóctel de tres fagos.

Teniendo en cuenta que la carne es comúnmente contaminada por *E. coli* O157 durante el desposte y que este patógeno alimentario es responsable de la alta incidencia de SUH en nuestro país (Rivas y col., 2006), se realizaron más estudios en carne con la cepa STEC O157:H7. A baja temperatura, los experimentos se realizaron durante un período prolongado (hasta seis días), mientras que a 24°C y 37°C, las incubaciones se realizaron sólo durante 24 h debido al deterioro de la carne, aunque se agregaron más tiempos de muestreo a los experimentos.

Las concentraciones de STEC O157:H7 en la carne tratada con fagos fueron 0,67 ± 0,17; 1,01 ± 0,21 y 1,55 ± 0,35 log₁₀ UFC/mL menores que las no tratadas a 4°C durante un día, tres días y seis días, respectivamente (Figura 5A). Es decir, las reducciones de STEC O157:H7 aumentaron a medida que la incubación se extendía hasta seis días en condiciones de refrigeración, lo que sugiere que el cóctel de fagos puede ser útil para el almacenamiento en frío de productos cárnicos. Cuando se llevó a cabo la incubación a 24°C y 37°C, las concentraciones de STEC O157:H7 en muestras tratadas con fagos fueron 3,41 ± 0,51 (24°C; Figura 5B) y 3,78 ± 0,38 (37°C; Figura 5C) log₁₀ UFC/mL menores respecto a las no tratadas después de una exposición de 24 h. Se obtuvieron resultados similares en ensayos de biocontrol con un

cóctel de tres fagos contra *E. coli* O157:H7 en carne a 37 °C (O'Flynn y col., 2004); mientras que, a la misma temperatura abusiva, Hudson y sus colaboradores lograron sólo una reducción de ~1 log₁₀ UFC/mL después de una exposición de 4 h, observándose un posterior recrecimiento de *E. coli* O157:H7 (10⁷ UFC) después de 20 h de incubación (Hudson y col., 2013).

Ninguno de los diez aislamientos de *E. coli* recuperados de las muestras al final de los experimentos en carne mostró ser resistente a la infección por el cóctel de fagos (datos no mostrados), como también encontraron Abuladze y col. (2008). Además, no se encontró resistencia para otros patógenos como *Salmonella* (Bigwood y col., 2008) y *Listeria* (Guenther y col., 2009). Estas observaciones pueden indicar que, a diferencia de los alimentos líquidos, las células bacterianas inoculadas en la carne escaparon del contacto con las partículas de fagos.

Nuestro cóctel de fagos demostró ser efectivo para reducir las poblaciones bacterianas en matrices de alimentos a temperaturas refrigeradas, ambiente y abusivas, como también se encontró con otros fagos (O'Flynn y col., 2004; Minh y col., 2016) y otros patógenos. (Bigwood y col., 2008; Guenther y col., 2009). Sin embargo, para mejorar el control biológico empleando fagos, otros autores han sugerido que los fagos pueden protegerse mediante microencapsulación (Ly-Chatain, 2014) o mejorando los mecanismos de administración (Inal, 2003); aunque en nuestros experimentos se podrían ensayar valores más altos de MOI para mejorar las reducciones alcanzadas.

CONCLUSIONES

Los hallazgos presentados en este trabajo mostraron que el uso de fagos contra *E. coli* mezclados en un cóctel fue eficaz contra el patógeno transmitido por los alimentos. Nuestro cóctel de fagos puede ser una herramienta prometedora para controlar patógenos transmitidos por los alimentos como *E. coli* EPEC y STEC a varias temperaturas, tanto en leche como en carne. Los fagos sobrevivieron con niveles elevados al final de todos los experimentos realizados, una característica deseable para la prevención de la recontaminación a través de la cadena de producción. Sin embargo, se requiere secuenciación y análisis bioinformático de nuestros seis fagos antes

de su aplicación en alimentos. Aunque varios autores han encontrado resultados alentadores con otros cócteles compuestos por fagos líticos contra *E. coli* (O'Flynn y col., 2004; Abuladze y col., 2008), previamente a este estudio no se llevaron a cabo ensayos en alimentos con un cóctel de seis fagos contra patógenos de *E. coli* circulantes en nuestra región.

REFERENCIAS

- Abedon, S.T., 2011. Lysis from without. *Bacteriophage* 1 (1), 46-49.
- Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M.Y., Dean, T., Senecal, A., Sulakvelidze, A., 2008. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6230-6238.
- Amagliani, G., Petruzzelli, A., Carloni, E., Tonucci, F., Fogliani, M., Micci, E., Ricci, M., Di Lullo, S., Rotundo, L., Brandi, G., 2016. Presence of *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* in raw ovine milk destined for cheese production and evaluation of the equivalence between the analytical methods applied. *Foodborne Pathog. Dis.* 20 (20), 1-7.
- Balague, C., Khan, A., Fernandez, L., Redolfi, A., Aquili, V., Voltattorni, P., Hofer, C., Ebner, G., Dueñas, S., Cerniglia, C.E., 2006. Occurrence of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ready-to-eat food from supermarkets in Argentina. *Food Microbiol.* 23, 307-313.
- Bigwood, T., Hudson, J.A., Billington, C., Carey-Smith, G.V., Heinemann, J.A., 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol.* 25, 400-406.
- Bourdin, G., Schmitt, B., Guy, L.M., Germond, J., Zuber, S., Michot, L., Reuteler, G., Brüssow, H., 2013. Amplification and purification of T4-Like *Escherichia coli* phages for phage therapy: from laboratory to pilot scale. *Appl. Environ. Microbiol.* 4, 1469-1476.
- Bryan, D., El-Shibiny, A., Hobbs, Z., Porter, J., Kutter, E., 2016. Bacteriophage T4 infection of stationary phase *E. coli*: life after log from a phage perspective. *Front. Microbiol.* 7, 1-12.
- Bueno, E., Garcia, P., Martínez, B., Rodríguez, A., 2012. Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 158, 23-27.
- Carlton, R.M., Noordman, W.H., Biswas, B., de Meester, E.D., Loessner, M.J., 2005. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatics analyses, oral toxicity study, and application. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 43, 301-312.
- Carter, C.D., Parks, A., Abuladze, T., Li, M., Woolston, J., Magnone, J., Senecal, A., Kropinski, A.M., Sulakvelidze, A., 2012. Bacteriophage cocktail significantly reduces *Escherichia coli* O157:H7 contamination of lettuce and beef, but does not protect against recontamination. *Bacteriophage* 2, 178-185.
- Dykes, G.A., Moorhead, S.M., 2002. Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 71-81.
- Endersen, L., Coffey, A., Neve, H., McAuliffe, O., Ross, R.P., O'Mahony, J., 2013. Isolation and characterisation of six novel mycobacteriophages and investigation of their antimicrobial potential in milk. *Int. Dairy J.* 28 (1), 8-14.
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condrón, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Miszczycha, S., Moussié, S., Verstraete, K., Cerf, O., 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.* 162 (2), 190-212.
- García, P., Madera, C., Martínez, B., Rodríguez, A., 2007. Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *Int. Dairy J.* 17, 1232-1239.
- García, P., Martínez, B., Obeso, J.M., Rodríguez, A., 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 479-485.
- Gill, J.J., Sabour, P.M., Leslie, K.E., Griffiths, M.W., 2006. Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K. *J. Appl. Microbiol.* 101, 377-386.
- Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., Loessner, M.J., 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 93-100.

- Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klimpp, J., Loessner, M.J., 2012. Biocontrol of *Salmonella typhimurium* in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 66–72.
- Gunders, D., 2012. Wasted: How America is losing up to 40 percent of its food from farm to fork to landfill. Natural Resources Defense Council Issue Paper IP:12–06-B. Nat. Resour. Def. Council., New York, NY.
- Gunders, D., 2012. Wasted: How America is losing up to 40 percent of its food from farm to fork to landfill. Natural Resources Defense Council Issue Paper IP:12–06-B. Nat. Resour. Def. Council., New York, NY.
- Hernandes, R.T., Elias, W.P., Vieira, M.A., Gomes, T.A., 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 297, 137–149.
- Hong, Y., Pan, Y., Ebner, P.D., 2014. Development of bacteriophage treatments to reduce *E. coli* O157:H7 contamination of beef products and produce. *J. Anim. Sci.* 92, 1366–1377.
- Hudson, J.A., Bigwood, T., Premaratne, A., Billington, C., Horn, B., McIntyre, L., 2010. Potential to use ultraviolet-treated bacteriophages to control foodborne pathogens. *Foodborne Pathog. Dis.* 7 (6), 687–693.
- Hudson, J.A., Billington, C., Cornelius, A.J., Wilson, T., On, S.L., Premaratne, A., King, N.J., 2013. Use of a bacteriophage to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Food Microbiol.* 36, 14–21.
- Inal, J.M., 2003. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 51, 237–244.
- Jamalludeen, N., Jonson, R.P., Friendship, R., Kropinski, A.M., Lingohr, E.J., Gyles, C.L., 2007. Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 124, 47–57.
- Jia, S., Zhang, X., Miao, Y., Zhao, Y., Ye, L., Li, B., Zhang, T., 2017. Fate of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community in livestock breeding wastewater and its receiving river water. *Water Res.* 124, 259–268.
- Kim, K., Klumpp, J., Loessner, M., 2007. Enterobacter sakasaki bacteriophages prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 195–203.
- Kudva, I.T., Jelacic, S., Tarr, P.I., Youderian, P., Hovde, C.J., 1999. Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3767–3773.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., Sulakvelidze, A., 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 69 (8), 4519–4526.
- Likar, K., Jevnik, M., 2006. Cold chain maintaining in food trade. *Food Control* 17, 108–113.
- Ly-Chatain, M.H., 2014. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Front. Microbiol.* 5 (51), 1–7.
- McLean, S.K., Dunn, L., Palombo, E.A., 2013. Phage inhibition of *Escherichia coli* in ultrahigh-temperature-treated and raw milk. *Foodborne Pathog. Dis.* 10 (11), 956–962.
- Minh, D.H., Minh, S.H., Honjoh, K., Miyamoto, T., 2016. Isolation and bio-control of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* contamination in raw chicken meat by using lytic bacteriophages. *LWT - Food Sci. Technol.* 71, 339–346.
- Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A., Griffiths, M.W., 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of Cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J. Food Prot.* 64, 927–933.
- Moradpour, Z., Sepehrizadeh, Z., Rahbarizadeh, F., Ghasemian, A., Yazdi, M. T., Shahverdi, A.R., 2009. Genetically engineered phage harbouring the lethal catabolite gene activator protein gene with an inducer independent promoter for biocontrol of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 296, 67–71.
- Mukhopadhyay, S., Ramaswamy, R., 2012. Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: A review. *Food Res. Int.* 45 (2), 666–677.
- Obeso, J.M., García, P., Martínez, B., Arroyo-Lopez, F., Garrido-Fernandez, A., Rodríguez, A., 2010. Use of logistic regression for prediction of the fate of *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk in the presence of two lytic phages. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (18), 6038–6046.
- O'Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W.J., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., 2005. Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 274–279.
- O'Flynn, G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Coffey, A., 2004. Evaluation of a Cocktail of Three Bacteriophages for Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (6) 3417–3424.
- Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G., Magnani M., 2009. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. *Food Microbiol.* 26, 615–622.
- Raya, R.R., Varey, P., Oot, R.A., Dyen, M.R., Callaway, T.R., Edrington, T.S., Kutter, E.M., Brabban, A.D., 2006. Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6405–6410.
- Rivas, M., Caletti, M.G., Chinen, I., Refi, S.M., Roldan, C.D., Chillemi, G., 2003. Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 1184–1186.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N., Leotta, G.A., 2006. Epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina. Etiologic agent diagnosis, reservoirs and routes of transmission. *Medicina* 66, 27–32.
- Rivas, M., Sosa-Estani, S., Rangel, J., Caletti, M.G., Valles, P., Roldan, C.D., Balbi, L., Marsano de Mollar, M.C., Amoedo, D., Miliwebsky, E., Chinen, I., Hoekstra, R.M., Mead, P., Griffin P.M., 2008. Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 763–771.
- Stewart, G., Jassim, S., Denyer, S., Newby, P., Linley, K., Dhir, V., 1998. The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4 h using bacteriophage amplification. *J. Appl. Microbiol.* 84, 777–783.
- Sulakvelidze, A., Barrow, P., 2005. Phage therapy in animals and agribusiness, p. 335–380. In E. Kutter and A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Swerdlow, D.L., Woodruff, B.A., Brady, R.C., Griffin, P.M., Tippen, S., Donnell, H.D. Jr., 1992. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann. Intern. Med.* 117, 812–819.
- Tarahovsky, Y.S., Ivanitsky, G.R., Khusainov, A.A., 1994. Lysis of *Escherichia coli* cells by bacteriophage T4 induced. *FEMS Microbiol. Lett.* 122, 195–200.
- Tomat, D., Migliore, L., Aquili, V., Quiberoni, A., Balague, C., 2013a. Phage biocontrol of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3 (20), 1–10.
- Tomat, D., Mercanti, D., Balague, C., Quiberoni, A., 2013b. Phage biocontrol of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during milk fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 57, 3–10.
- Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Diez-Gonzalez, F., 2011. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde. *Food Microbiol.* 28, 149–157.
- Yılmaz, C., Özcengiz, G., 2017. Antibiotics: pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. *Biochem. Pharmacol.* 133, 43–62.
- Zuber, S., Boissin-Delaporte, C., Michot, L., Iversen, C., Diep, B., Brüssow, H., Breeuwer, P., 2008. Decreasing *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) food contamination level with bacteriophages: prospects and problems. *Microb. Biotechnol.* 1 (6), 532–543.