



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
BACTERIÓFAGOS CON ACTIVIDAD INHIBITORIA DE
BACTERIAS DETERIORADORAS EN CERVEZA “**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestro en
Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

IQAI. Alexia Joana López Gachuzo

Dirigido por:

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Querétaro, Qro. a 12 de enero 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Aislamiento y caracterización de bacteriófagos con
actividad inhibitoria de bacterias deterioradoras en
cerveza.

por

Alexia Joana López Gachuzo

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: FQMAC-220286-0223-123



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
BACTERIÓFAGOS CON ACTIVIDAD INHIBITORIA
DE BACTERIAS DETERIORADORAS EN CERVEZA”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestro en
Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta
IQAI. Alexia Joana López Gachuzo

Dirigido por
Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Presidente

Dr. Mauricio A. Redondo Solano

Secretario

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Vocal

Dra. Dalía E. Miranda Castilleja

Sinodal

Dra. Silvia L. Amaya Llano

Sinodal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Enero 2023
México

DEDICATORIAS

A mis padres, que siempre han creído en mí y me han apoyado en querer ser una gran investigadora. Este trabajo es por y para ustedes.

A toda mi familia, que me quieren mucho y que están muy orgullosos de mí.

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

ALEXIA JOANA LÓPEZ GACHUZO

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'A' and 'J' followed by a vertical line and a 'G'.

AGADECIAMIENTOS

A Dios, por regresar al camino de la investigación y así poder redescubrir mi pasión por la ciencia.

A mis padres por dejar todo para que yo siga estudiando y superándome, por cuidarme siempre y preocuparse tanto por mí. Gracias mamá por tus pláticas, consejos y por alimentarme tan rico siempre, por estar orgullosa de mí y siempre ayudarme a ver lo bueno de las cosas. Gracias papá por enseñarme a ser responsable y a luchar por mis sueños, por estar orgulloso de mí. A mi Morris que estuvo tantas horas a mi lado mientras hacía exámenes, tomaba clases y estudiaba, pero ahora me acompaña desde el cielo.

A mi familia, por siempre apoyarme, echarme porras y ponerme de ejemplo para los más jóvenes.

A la Dra. Sofi, por creer en mí y nunca detenerme, por darme tanta confianza y ayudarme a seguir mis sueños, porque desde que la conocí en licenciatura allá por el 2016 siempre me ayudó con una sonrisa y de una manera tan amable y linda que le agradeceré por siempre. Ha sido un gran gusto y honor al fin poder haber trabajado con usted.

A la Dra. Dalia igualmente tan linda y amable siempre, por llevarme a los muestreos, por aceptarme de oyente en su clase, por siempre ayudarme con mis dudas tanto existenciales como académicas desde licenciatura hasta posgrado, y por ser mi sinodal.

A mis asesores de tesis: Dra. Montse por inspirarme a ser mejor siempre y acompañarme en mi primer IAFP, Dra. Silvia y Dr. Mauricio por sus comentarios y aportaciones sobre mi proyecto. De igual manera a los Ing. Andrés y Mauricio por las facilidades para los muestreos.

A mis amigos que me ayudaron de la mejor manera, con quienes compartí muchos éxitos, presentaciones y también fracasos y experimentos fallidos: Mon, Lavín, Ángel, Esme, Rodri, Cris, Italia, Yessi, Pao, Lalo y Georgeo.

A mis chicos de servicio por ayudarme con toda la actitud y hacer más divertidos los días de laboratorio: Mau, Bryan, Emilio y más especialmente a Nicole y Pablito que fueron una parte fundamental de este proyecto, a todos ustedes ojalá hayan aprendido mucho, los tkm.

A CONACyT por haberme apoyado durante mis años de estudiante.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | v |
| ABSTRACT | vi |
| | |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| | |
| I. ANTECEDENTES..... | 3 |
| I.1 Microorganismos en cerveza y su deterioro | 3 |
| I.1.2 Bacterias ácido lácticas | 4 |
| I.1.3 Bacterias ácido acéticas. | 6 |
| I.1.4 <i>Bacillus cereus</i> | 8 |
| I.1.5 Métodos de control de BAL, BAAC y <i>Bacillus</i> en la industria de alimentos..... | 9 |
| I.2 Bacteriófagos..... | 11 |
| I.2.1 Características generales | 11 |
| I.2.2 Aplicaciones en procesos de alimentos | 12 |
| I.2.3 Aislamiento y detección | 13 |
| I.2.4 Bacteriófagos en bebidas alcohólicas..... | 15 |
| I.2.5 Caracterización..... | 16 |
| | |
| II. OBJETIVOS | 18 |
| II.1 General..... | 18 |
| II.2 Específicos..... | 18 |
| | |
| III. METODOLOGÍA | 18 |
| III.1 Materiales más relevantes..... | 18 |
| III.1.1 Equipo | 18 |
| III.1.2 Medios de cultivo | 18 |
| III.1.3 Soluciones..... | 19 |
| III.1.4 Reactivos | 19 |
| III.2 Métodos..... | 20 |
| III.2.1 Aislamiento de bacterias deterioradoras | 20 |
| III.2.2 Identificación de bacterias deterioradoras..... | 20 |
| III.2.3 Activación de cepas bacterianas | 21 |
| III.2.4 Evaluación de la capacidad de deterioro de las cepas | 21 |
| III.2.5 Obtención de bacteriófagos en aguas residuales y superficies | 23 |
| III.2.5.1 Recolección de muestras | 23 |
| III.2.5.2 Enriquecimiento y aislamiento de los bacteriófagos..... | 23 |
| III.2.6 Detección y cuantificación de bacteriófagos | 24 |
| III.2.7 Evaluación del efecto antimicrobiano de los bacteriófagos aislados sobre bacterias deterioradoras en suspensión y adheridas..... | 26 |

| | |
|---|----|
| III.2.8 Evaluación del efecto antimicrobiano de bacteriófagos seleccionados en Cerveza pilsner..... | 26 |
| III.2.9 Caracterización de bacteriófagos específicos de BAL y <i>Bacillus</i> mediante PCR..... | 27 |

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

| | |
|---|----|
| IV.1 Aislamiento e identificación de BAL y BAAC..... | 30 |
| IV.2 Capacidad de deterioro de las cepas seleccionadas..... | 32 |
| IV. 3 Aislamiento y cuantificación de bacteriófagos..... | 40 |
| IV. 4 Efecto antimicrobiano de los bacteriófagos aislados sobre bacterias ácido lácticas y ácido acéticas en suspensión y adheridas..... | 42 |
| IV.5 Efecto antimicrobiano de bacteriófagos seleccionados en cerveza pilsner..... | 44 |
| IV.4Evaluación del efecto antimicrobiano de los bacteriófagos aislados sobre bacterias ácido lácticas y ácido acéticas en suspensión y adheridas..... | 40 |
| V. Conclusiones..... | 52 |
| VI. Anexos..... | 53 |
| VII. Referencias..... | 56 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Métodos para la detección de bacteriófagos. | 14 |
| Cuadro 2. Métodos utilizados para la caracterización de bacteriófagos. | 16 |
| Cuadro 3. Iniciadores de bacteriófagos para PCR. | 27 |
| Cuadro 4. Condiciones de PCR para iniciadores de bacteriófagos..... | 28 |
| Cuadro 5. Identificación de cepas bacterianas..... | 30 |
| Cuadro 6. Aislamiento de bacteriófagos de bodega vinícola y cervecerías artesanales. | 41 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Formato de evaluación sensorial para la prueba de control-diferencia.. | 21 |
| Figura 2. Ejemplo en la aplicación de la prueba de puntos | 24 |
| Figura 3. Cuantificación de BAL y <i>B. cereus</i> en cerveza pilsner almacenada a 25 °C durante 21 días | 33 |
| Figura 4. Densidad óptica en cerveza pilsner inoculada con BAL y <i>B. cereus</i> almacenada a 25 °C por 21 días..... | 34 |
| Figura 5. Nivel de pH en cerveza pilsner inoculada con BAL y <i>B. cereus</i> almacenada a 25 °C por 21 días..... | 35 |
| Figura 6. ANOVA del pH en cerveza pilsner inoculada con BAL y <i>B. cereus</i> almacenada a 25 °C por 21 días..... | 36 |
| Figura 7. ANOVA de la acidez en cerveza pilsner inoculada con BAL y <i>B. cereus</i> almacenada a 25 °C por 21 días..... | 37 |
| Figura 8. Acidez (expresada en eq/ml) en cerveza pilsner inoculada con BAL y <i>B. cereus</i> almacenada a 25 °C por 21 días..... | 38 |
| Figura 9. Prueba sensorial control-diferencia en cerveza pilsner inoculada con BAL y <i>B. cereus</i> y almacenada a 25°C por 21 días | 39 |
| Figura 10. Obtención de bacteriófagos después de la amplificación y precipitación con PEG | 40 |
| Figura 11. Efecto de bacteriófagos MAI, ME1 y MLG en células suspendidas (A) y células adheridas de BAL y <i>B. cereus</i> (B)..... | 43 |
| Figura 12. Población de bacterias deterioradoras debido a la aplicación de bacteriófagos en cerveza pilsner durante su almacenamiento a 25 °C. | 45 |
| Figura 13. Densidad óptica en cerveza pilsner inoculada con bacterias deterioradoras y bacteriófagos..... | 46 |
| Figura 14. Efecto en el pH en cerveza pilsner inoculada con bacterias deterioradoras y bacteriófagos..... | 47 |
| Figura 15. Efecto en la acidez en cerveza pilsner inoculada con bacterias deterioradoras y bacteriófagos..... | 48 |
| Figura 16. Prueba sensorial control-diferencia en cerveza pilsner inoculada con bacterias deterioradoras y bacteriófagos | 49 |

RESUMEN

La cerveza es una de las bebidas más consumidas alrededor del mundo. Actualmente la preferencia de los consumidores por productos artesanales ha llevado a un auge constante a la industria de la cervecería artesanal, sin embargo, uno de los problemas que enfrentan es el deterioro. Las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas juegan un papel importante, así como algunos tipos de *Bacillus*. En las bebidas alcohólicas se ha reportado deterioro por estos microorganismos que producen biopelículas, aminas biogénicas, turbidez y elevación de la viscosidad de dichos productos. El uso de bacteriófagos como bioconservadores podría ser una forma de controlar el problema que enfrentan principalmente las cervecerías artesanales. El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar bacteriófagos con actividad inhibitoria de bacterias deterioradoras de cerveza. Se realizaron 9 muestreos en cervecerías artesanales y bodegas vinícolas a partir de los cuales se recolectaron 68 muestras y se aislaron 72 cepas bacterianas, de las cuales 3 se identificaron como *Lactiplantibacillus pentosus*, una como *Leuconostoc mesenteroides*, una como *Leuconostoc citreum* y una como *Bacillus cereus*; de estas cepas solamente un *Lb. pentosus*, *Lc. citreum* y *B. cereus* mostraron capacidad de deterioro en cerveza. Se aislaron 8 bacteriófagos mediante la técnica de agar de doble capa y se evaluó la eficiencia de tres de ellos (MAI, ME2 y MLG) en cerveza, para ello se inocularon 100 mL de cerveza comercial con cada cepa deterioradora (10^4 UFC/mL) y cada bacteriófago (10^5 UFP/mL) se almacenaron a 25 °C durante 21 días. Cada semana se midió el pH, acidez, densidad óptica y a la par se cuantificaron las poblaciones viables. Al final del estudio se realizó una evaluación sensorial de aroma control-diferencia. Con la aplicación de los bacteriófagos se obtuvo una reducción de 0.8 log UFC/mL en *Lb. pentosus* 9 (BAL-9) y 1 log UFC/mL para *Lc. Citreum* (BAL-5), mientras que para *B. cereus* la población se redujo 1.2 log UFC/mL y no hubo cambios sensoriales significativos en la cerveza; estos resultados muestran que la aplicación de bacteriófagos como un potencial bioconservador en cerveza artesanal.

Palabras clave: Bebidas fermentadas, bacterias lácticas, bacterias acéticas, bacteriófagos, prevención del deterioro.

ABSTRACT

Beer is one of the most consumed beverages around the world. Currently, the preference of consumers for craft products has led to a constant boom in the craft brewery industry, however, one of the problems they face is spoilage. Lactic acid and acetic acid bacteria play an important role, as well as some types of *Bacillus*. In alcoholic beverages, deterioration has been reported due to these microorganisms that produce biofilms, biogenic amines, turbidity and increased viscosity of said products. The use of bacteriophages as biopreservatives could be a way to control the problem faced mainly by craft breweries. The aim of this study was to isolate and characterize bacteriophages with inhibitory activity against beer spoilage bacteria. Nine samplings were carried out in craft breweries and wineries, from which 68 samples were collected and 72 bacterial strains were isolated, of which 3 were identified as *Lactiplantibacillus pentosus*, one as *Leuconostoc mesenteroides*, one as *Leuconostoc citreum* and one like *Bacillus cereus*; of these strains only one *Lb. pentosus*, *Lc. citreum* and *B. cereus* showed spoilage capacity in beer. Eight bacteriophages were isolated using the double-layer agar technique and the efficiency of three of them (MAI, ME2 and MLG) in beer was evaluated, for which 100 mL of commercial beer were inoculated with each spoilage strain (10^4 CFU/mL). and each bacteriophage (10^5 PFU/mL) were stored at 25 °C for 21 days. Every week the pH, acidity, optical density were measured and at the same time the viable populations were quantified. At the end of the study, a control-difference aroma sensory evaluation was performed. With the application of bacteriophages, a reduction of 0.8 log CFU/mL was obtained in *Lb. pentosus* 9 (BAL-9) and 1 log CFU/mL for *Lc. citreum* (BAL-5), while for *B. cereus* the population was reduced by 1.2 log CFU/mL and there were no significant sensory changes in beer; these results show the application of bacteriophages as a potential biopreservative in craft beer.

Keywords: Fermented beverages, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, bacteriophages, spoilage prevention.

INTRODUCCIÓN

La cerveza es una bebida alcohólica a base de malta consumida en todo el mundo. Los registros escritos más antiguos sobre el consumo de cerveza datan del 2800 a. C., pero los historiadores creen que la cerveza o las bebidas similares a la cerveza se consumían mucho antes. Miles de millones de litros se consumen cada año, lo que convierte a la cerveza en una de las bebidas más populares en la actualidad (Dysvik y col., 2020). En los últimos años se ha producido un importante crecimiento de las cervecerías artesanales independientes, incluso en países sin tradición cervecera (Villacreces y col., 2022) sin embargo uno de los problemas que enfrenta este sector es el deterioro. El deterioro más frecuente es debido a la actividad microbiana, que involucra varios mecanismos que afectan las características sensoriales incluyendo cambios en la textura, el sabor, el aroma e incluso color; y con ello se genera el rechazo por los consumidores (Rawat, 2015). Además de la presencia de microorganismos deterioradores, son elementos clave para el proceso de deterioro el pH, la temperatura y el uso de conservadores (Gill, 2017).

Las bacterias ácido-lácticas, ácido acéticas y algunos *Bacillus* juegan un papel importante en el deterioro de las bebidas alcohólicas. Estos grupos de bacterias son persistentes en la producción en ambientes de la producción de alimentos y destacan por su capacidad para formar biopelículas, desarrollar turbidez, su resistencia a niveles de pH bajos y ante agentes inhibidores como el alcohol y ácidos orgánicos (Zhou y col., 2016; MamLouk y Gullo, 2013). La ciudad de Querétaro, en México es conocida por la extensa cultura que tiene acerca de la Cerveza Artesanal, produciéndola de manera local. La Asociación de Cerveceros Artesanales de México ubica a la entidad dentro de los primeros cinco lugares de producción de esta bebida (Querétaro Ciudad, 2023), siendo una fuente importante de trabajo en la región. El manejo de las bacterias deterioradoras en la industria alimentaria está enfocado generalmente en su uso tecnológico y no en el problema de deterioro que causan. Este problema del deterioro de la cerveza genera pérdidas económicas para las cervecerías e incluso una pérdida de confianza del consumidor (Yu y col., 2019). Las

estrategias de control que actualmente se utilizan contra el deterioro de los alimentos, incluidas las cervezas artesanales se basan en limpieza y desinfección, en algunas otras se utilizan conservadores o empaques funcionales, sin embargo, no se ha descrito alguna estrategia específica para el control de bacterias deterioradoras.

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 y col., 2017). Estos virus se han convertido en agentes importantes para el control de las bacterias, en el área médica (Principi y col., 2014) y en la agricultura y en alimentos procesados como bio-protectores que eliminan bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Listeria* y *Salmonella* (Jurač y col., 2019). Algunos estudios han propuesto la aplicación de bacteriófagos como bio conservadores en cerveza, sin embargo, los bacteriófagos aislados no han sido aplicados directamente en la cerveza (Wang y col. 2016; Shin y col., 2011).

Por esta razón el objetivo de este estudio es aislar y caracterizar bacteriófagos con actividad inhibitoria de bacterias deterioradoras de cerveza aisladas del mismo ambiente de producción. Esto ayudará a reducir el deterioro en cerveza artesanal y prevenir pérdidas económicas.

I. ANTECEDENTES

I.1 Microorganismos en cerveza y su deterioro

Las cervezas se producen mediante fermentaciones espontáneas en las que intervienen numerosas especies de levaduras y bacterias. Una de las características que separa a los distintos tipos de cervezas ácidas es la alta concentración de ácidos orgánicos como el ácido láctico y el ácido acético, producida por cepas específicas, lo que da como resultado un pH reducido y un mayor sabor ácido (Dysvik y col., 2022). La cerveza se considera una bebida microbiológicamente segura debido a una serie de obstáculos antimicrobianos intrínsecos, que incluyen etanol, compuestos amargos del lúpulo, pH bajo, dióxido de carbono elevado, oxígeno bajo y muy pocos nutrientes (Vriesekoop y col., 2012). Sin embargo, algunos microorganismos aún logran crecer en la cerveza y causar turbidez y mal sabor.

El deterioro de los alimentos puede definirse como un proceso o cambio que hace que un producto sea indeseable o inaceptable para el consumo (Nychas y col., 2011); en la cerveza este puede darse por actividad microbiana, la cual involucra varios mecanismos complejos que modifican negativamente los atributos sensoriales y los consumidores llegan a rechazar el alimento; es común la presencia de líquido viscoso y cambios en la textura provocados por la degradación de proteínas, carbohidratos y lípidos además de la percepción de olores y sabores extraños (Gram y col., 2002); y puede ser causado por la acción de algunas enzimas producidas por los microorganismos presentes (Ray, 2005). Los microorganismos deterioradores son muy importantes, puesto que provocan cambios sensoriales negativos, siendo los causantes de cambios en la textura, malos olores y sabores cuando los alimentos en general están en mal estado (Rawat, 2015). Dentro de un alimento en descomposición, generalmente hay una sucesión de diferentes poblaciones que aumentan y disminuyen a medida que los nutrientes están disponibles o se agotan (Rawat, 2015). El deterioro provocado la actividad microbiana en cerveza artesanal representa una proporción significativa de las pérdidas económicas. La relación entre el crecimiento microbiano y los cambios químicos que ocurren durante el

almacenamiento de bebidas se ha reconocido como un indicador potencial que puede ser útil para monitorear la inocuidad (Nychas y col., 2011).

Se han utilizado varios procesos para minimizar el deterioro microbiano, entre los cuales el almacenamiento a baja temperatura y el tratamiento térmico parecen ser los más eficaces (Nasery y col., 2016). Sin embargo, la preferencia de los consumidores modernos por alimentos frescos con una vida útil prolongada y productos libres de pesticidas químicos hace que los alimentos sean más vulnerables al deterioro, además de aumentar la diversidad de especies de deterioro (Petruzzi y col., 2017). Dentro de los microorganismos deterioradores más importantes en la cerveza se encuentran las BAAC, las bacterias ácido lácticas y algunas bacterias del género *Megasphaera* y *Bacillus* ((Suzuki y col., 2008; Nychas y col., 2011).

I.1.2 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias que producen principalmente ácido láctico a partir de la degradación de azúcares, son Gram positivas, no esporulan, incluyen bacterias con forma de cocos y bacilos, generalmente son inmóviles, anaerobias o aerotolerantes, tienen un amplio rango de temperatura de crecimiento 5-45°C, tolerancia a la sal, no producen pigmentos, no reducen nitratos, no producen catalasa, pueden secretar proteínas efectoras, producir exopolisacáridos y adherirse y generar biopelículas (Hernández y col., 2007; Maciel, 2012, Zhou y col., 2016). Estas bacterias se adaptan a diversas condiciones y cambios de acuerdo a su metabolismo; cubren una gran variedad de géneros incluyendo *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Carnobacterium* y *Weisiella*. Se encuentran en diversos ambientes como la tierra, agua en general, aguas residuales y son microorganismos residentes o transitorios del tracto gastrointestinal en humanos y animales (Nikita & Hemangi, 2012). Se ha admitido que el microbioma intestinal tiene un impacto profundo en la salud y en las enfermedades crónicas, considerando a las bacterias lácticas como microorganismos deseables en el intestino (George y col.,

2018). Las BAL pueden generar un impacto o efecto intencional en los productos y su funcionalidad, son utilizadas en la industria alimentaria en procesos de fermentación láctea y tanto su acción como sus productos metabólicos impactan en las características organolépticas en alimentos que requieren el desarrollo de perfiles de sabores o en productos como el yogurt, queso, chucrut, pan, jamones, aceitunas, salsa de soya, pepinillos, entre otros (Marcó y col., 2012).

El deterioro causado por las BAL se debe principalmente a la producción de metabolitos que causan cambios indeseables en la apariencia, textura y sabor de los alimentos (Massaiger, 2006). Los sustratos principales que utilizan son los carbohidratos y dependiendo del producto final de su fermentación, las BAL se dividen en tipos: homo y heterofermentativas. Las BAL homofermentativas producen solo ácido láctico, que son responsables del sabor amargo, mientras que las heterofermentativas forman adicionalmente compuestos como etanol, ácido butírico, sulfuros, lactato y acetato (Odeyemi y col., 2020). El ácido butírico que se forma durante el deterioro de la carne se reconoce por su sabor rancio. Las BAL predominan en la carne envasada al vacío y se han visto involucradas tanto en la fermentación de alimentos como en su deterioro; por ello se busca reducir su crecimiento en algunos productos (Kalschne y col., 2015).

El deterioro se asocia a recuentos microbianos de alrededor de 10^6 UFC/g (Odeyemi y col., 2020). Las BAL que se han asociado al deterioro en productos cárnicos son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella* sp. y *Enterococcus* sp (Kalschne y col., 2015). Como resultado de la actividad de las BAL en estos alimentos se pueden observar sabores y olores ácidos por la disminución del pH, exudados lechosos, producción de gas, hinchazón del empaque, decoloración y/o colores verdosos (Audenaert y col., 2010). Incluso se ha reportado que las BAL contribuyen activamente en el deterioro de jamón cocido rebanado empacado al vacío con atmósferas modificadas (Kreyenschmidt y col., 2010) así como en frutas y verduras recién cortadas que se envasan con $<2\%$ O_2 y $>10\%$ CO_2 almacenadas a $7\text{ }^\circ\text{C}$ o más (Sperber & Doyle, 2009). *Lactobacillus sakei* forma H_2S , que convierte la mioglobina en sulfomioglobina

de color verde. El H₂S se forma a partir de cisteína, pero solo cuando la glucosa y el oxígeno son limitados y cuando se agota la glucosa, *L. sakei* hidroliza la arginina dando como resultado la formación de amoníaco y aminas biogénicas como la putrescina y la espermina (Odeyemi y col., 2020).

En productos alcohólicos se ha reportado el deterioro causado por BAL en bebidas como el sake y la cerveza, ya que hay algunas cepas que son altamente tolerantes al etanol y son capaces de tener actividad en estos ambientes adversos. Los compuestos de lúpulo en la cerveza ejercen un efecto antibacteriano al actuar como ionóforos y disipan el gradiente de pH transmembranal, que evita que las cepas de BAL ordinarias crezcan en la cerveza y es por ello que la capacidad de resistencia al lúpulo se ha descrito como un carácter distintivo de las cepas de deterioro en la cerveza (Suzuki y col., 2008). Las BAL también influyen en el deterioro en vinos, se ha reportado la presencia de especies de *Lb. plantarum*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* en vinos producidos con dosis bajas de dióxido de azufre y que no son suplementados con iniciadores malolácticos específicos, hasta con un nivel de pH del mosto de 3.78 – 3.90; los altos valores de pH pudieran contrarrestar la actividad del dióxido de azufre añadido, lo que permite la proliferación de estos microorganismos que deterioran el vino. Los defectos incluyen amargor, malos sabores y fallas visuales sensoriales, como formación de película, turbidez, viscosidad y sedimentos (Beneduce y col., 2004; Cosme y col., 2018). Las BAL también pueden liberar ácidos hidroxicinámicos de sus ésteres tartáricos y tienen el potencial de descomponer los glucósidos de la antocianina, lo que afecta el color del vino (Viridis, 2021).

1.1.3 Bacterias ácido acéticas

Las bacterias ácido acéticas (BAAC) son bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas, con forma elipsoidal o de bastones que pueden encontrarse en cadenas simples, pares o cortas. Son móviles por la presencia de flagelos peritricos o polares, son catalasa positiva y oxidasa negativa. Son bacterias aerobias obligadas que

pertenecen a la familia Acetobacteraceae y tienen un pH óptimo de desarrollo de 5-6.5, sin embargo, pueden crecer a valores más bajos (MamLouk y Gullo, 2013). Se reconocen diez géneros de la familia Acetobacteraceae, Alphaproteobacteria: Acetobacter, Gluconobacter, Acidomonas, Gluconacetobacter, Asaia, Kozakia, Swaminathania, Saccharibacter, Neoasaia y Granulibacter (Yamada, 2016). Las BAAC están ampliamente distribuidas en nichos dulces, ácidos y alcohólicos y pueden oxidar polioles a cetonas como glicerol a dihidroxiacetona (Ronald, 2008).

Las BAAC son utilizadas para llevar a cabo reacciones específicas de oxidación a través de fermentaciones oxidativas, especialmente en la producción de vinagre, el vino de palma, polvo de cacao, nata de coco, pulque y kombucha. En las últimas décadas la fisiología de las BAAC ha sido ampliamente estudiada por su papel en la producción de alimentos, donde actúan como microorganismos benéficos o deterioradores, así como en la industria biotecnológica donde se explota su maquinaria de oxidación para producir un gran número de compuestos como el ácido L-ascórbico, dihidroxiacetona, ácido glucónico y celulosa (MamLouk y Gullo, 2013). Este tipo de bacterias también pueden deteriorar las bebidas fermentadas como el vino, la sidra y la cerveza donde la producción de ácido acético es indeseable, mientras que en otros alimentos como la masa madre para la producción de pan, las BAAC pueden aparecer ocasionalmente contribuyendo a la acidificación de la masa (MamLouk y Gullo, 2013).

La especie de BAAC típicamente asociada con las uvas y el mosto es *Gluconobacter oxydans*; las BAAC asociadas con el vino son *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus* que prefieren el etanol como fuente de carbono, al igual que *Gluconacetobacter liquefaciens*; cuando estos microorganismos están presentes durante la vinificación, el envejecimiento o el almacenamiento del vino, metabolizan el etanol a acetaldehído produciendo ácido acético (Longin y col., 2016). Como resultado de las actividades oxidativas de las BAAC, los productos de oxidación como el ácido carboxílico se acumulan en el medio de cultivo. Estas reacciones oxidativas son catalizadas por deshidrogenasas primarias, ubicadas en la superficie

exterior de la membrana citoplasmática (Adachi y col., 2007). *Gluconobacter* tiene características de aeróbio a microaerófilico y puede tolerar condiciones de bajo pH y concentraciones de etanol que se encuentran normalmente en la cerveza; pueden crecer a 18 °C, utilizando prolina como fuente de nitrógeno. Por otro lado, *Acetobacter* puede oxidar el ácido acético generado a CO₂ y agua. Como consecuencia, se genera un sabor avinagrado en la bebida alcohólica, con un pH y contenido de etanol reducido (Odhav, 2004). Teniendo en cuenta la capacidad de AAB para convertir el etanol en ácido acético, estas bacterias se consideran bacterias de deterioro en la industria del vino (Longin y col., 2016), además de que pueden ingresar al proceso de producción y actuar como deterioradores durante la fermentación o maduración de bebidas alcohólicas como el vino, sidra y cerveza; así como en agua con sabor a frutas y bebidas no alcohólicas, causando un olor agrio y sabor indeseable en estos productos. Otro problema puede ocurrir en la industria del vinagre, cuando un gran volumen de celulosa se acumula en los fermentadores, requiriendo limpieza frecuente por parte del operador. Incluso en el vinagre convencional, este fenómeno puede ocurrir si las BAAC no se eliminan bien en la filtración, antes del embotellado ya que con la formación de películas se genera un aspecto turbio en el producto (Gomes y col., 2018).

1.1.4 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es una bacteria Gram positiva, esporulada, móvil y con forma de bastón que ha sido reconocida como agente de intoxicación alimentaria durante más de 640 años (Gheraldi y col., 2002). Es un patógeno oportunista formador de endosporas y debido a su capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas (5 – 55 °C) está ampliamente distribuido en varios ambientes y comúnmente es aislado de diversos alimentos y aditivos alimentarios (Shin y col., 2011). *B. cereus* puede sobrevivir en condiciones desfavorables, como la inanición o en un ambiente seco o con poco oxígeno, durante muchos años en forma de esporas. La leche y los productos lácteos han sido vehículos de este microorganismo corren un riesgo particular porque las esporas sobreviven en productos pasteurizados y otros tratados

térmicamente, como la leche en polvo y el queso (Vidic y col., 2020). Además de su potencial toxigénico, *B. cereus* puede causar otros problemas en los alimentos ya que este microorganismo se ha reportado como deteriorador y confiere a los alimentos un sabor a "crema cortada" o a cuajada dulce de leche. Esto se debe a su actividad proteolítica en ausencia de altos niveles de producción de ácido (Robinson, 2014).

I.1.5 Métodos de control de BAL, BAAC y *Bacillus* en la industria de alimentos

Los alimentos que tienen alta acidez, pH bajo o que se envasan al vacío, como productos a base de tomate, aderezos para ensaladas y carnes procesadas, son particularmente susceptibles al deterioro por BAL, por lo que deben ser controlados cuidadosamente para evitar la contaminación, ya que si bien la presencia de nitritos impide que la mayoría de los microorganismos psicrótrofos desarrollen en los productos después de cocinarlos, este no es el caso de las BAL que desarrollan a bajas temperaturas, cuyo crecimiento continúa y eventualmente pueden causar deterioro (Hamasaki y col., 2003). Las BAL que sobreviven a la desinfección pueden actuar como agentes de deterioro y afectar algunos alimentos. Se ha reportado el deterioro en carnes procesadas envasadas al vacío en donde los principales agentes responsables fueron *Lactobacillus sakei* y *Lc. mesenteroides* debido a una contaminación cruzada. Por esta razón en la industria se utilizan desinfectantes como las sales cuaternarias de amonio en los equipos para evitar el desarrollo de estos microorganismos (Sidhu y col., 2001). Otro método de control contra las BAL son los conservadores químicos como el ácido fumárico, cinamaldehído, sorbato de potasio, metabisulfito de sodio y natamicina que se han utilizado en las aceitunas envasadas (Romero y col., 2016). Mientras que, en la industria cárnica además de las consideraciones generales de higiene, se utiliza un empaquetado en atmósfera modificada con control de temperatura apropiado con 30-40% de CO₂ para prevenir el deterioro temprano, pero si bien se suprimen las bacterias Gram negativas del deterioro, las BAL psicrótrofas no se ven afectadas (Krockel, 2013).

Las esporas de *B. cereus* se propagan fácilmente y pueden resistir bajas y altas temperaturas, desecación, agentes desinfectantes, ionización, radiación y luz ultravioleta; estas esporas se encuentran en todas las categorías de alimentos (como cárnicos, lácteos, verduras y arroz), ya que se distribuyen ampliamente en el suelo, el aire, el agua, las plantas y los animales. Afortunadamente, el tratamiento con temperatura ultra alta (UHT), que se usa comúnmente para producir leche de consumo de manera efectiva, inactiva las esporas de *B. cereus* (Vidic y col., 2020), sin embargo, este tratamiento al ser tan agresivo no puede ser aplicado en todas las matrices alimentarias.

Los aceites esenciales se pueden utilizar para controlar el deterioro de los alimentos, la oxidación de lípidos y para eliminar las bacterias patógenas (Linares y col., 2018). Los componentes de los aceites esenciales con actividad antimicrobiana probada incluyen timol de tomillo y orégano, eugenol de clavo, cinamaldehído y ácido cinámico presentes en la canela y jasmonato de metilo presente en aceite esencial de jazmín (Linares y col., 2018). Otra manera de prevenir la actividad de microorganismos deterioradores es utilizando recubrimientos comestibles en los alimentos como frutas y hortalizas. Un complemento a la aplicación de compuestos antimicrobianos en los alimentos es el envasado/empacado con atmósferas modificadas que puede reducir el deterioro por microorganismos en productos frescos (Linares y col., 2018).

La biopreservación se define como “el uso de microorganismos (incluidos los bacteriófagos), sus productos metabólicos, o ambos para conservar alimentos que generalmente no se consideran fermentados” (Quinto y col., 2019). Algunos hongos y bacterias producen metabolitos secundarios que poseen actividad antimicrobiana contra los microorganismos patógenos y de descomposición, por lo que se pueden aplicar en productos alimenticios (Arshal y Batool, 2017). En esta categoría de bio preservadores también se encuentran los bacteriófagos, ya que también se pueden aplicar para el control de las bacterias deterioradoras o patógenas y no conllevan

ningún riesgo a la salud ya que son consumidos habitualmente en la dieta al ser componentes naturales de la microbiota de los alimentos (Quinto y col., 2019).

I.2 Bacteriófagos

I.2.1 Características generales

Los bacteriófagos son virus ubicuos por naturaleza e infectan sólo células bacterianas; son considerados como la entidad más abundante y diversa en la tierra ya que se piensa que existen en todos los ecosistemas desde los ambientes más calientes hasta los más fríos (Sharma y col., 2017). Se ha demostrado que los fagos tienen funciones ecológicas importantes, ya que expresan una gran variedad de genes metabólicos auxiliares (Breitbart, 2012., Weitz y Wilhelm 2013). Una sola partícula del fago puede afectar una bacteria específica o un subconjunto de las mismas especies. Una vez que la célula bacteriana es infectada, los fagos se multiplican exponencialmente usando la maquinaria celular de la bacteria incluyendo los sistemas de síntesis de proteínas y generadores de energía. El método de propagación puede ser lítico o lisogénico. Algunos fagos causan la lisis de las células bacterianas del huésped para liberar la progenie del virus (Young y col., 2000). Por otro lado, los bacteriófagos lisogénicos insertan su genoma dentro de la bacteria huésped y la infectan, transfiriendo sus genes que expresan proteínas de toxinas o factores patógenos para ciertas especies de bacterias (Sabouri y Mohammadi, 2012).

Los bacteriófagos se clasifican en Caudovirales, Ackermannviridae, Myoviridae, Siphoviridae y Podoviridae (Dmitri, 2021). La aplicación de fagos para controlar ciertas bacterias se complica por los altos grados de diversidad fenotípica dentro de poblaciones de ambos, fagos y bacterias. En consecuencia, las cepas individuales de un patógeno pueden ser más o menos susceptibles o incluso resistentes a diferentes fagos coexistentes, sin embargo, se sabe que todos los géneros de bacterias, incluyendo cianobacterias, archaeobacterias y micoplasmas son vulnerables a una plétora de fagos (Shende y col., 2017).

I.2.2 Aplicaciones en procesos de alimentos

Los bacteriófagos se caracterizan por una alta especificidad, característica importante que permite su uso en la industria alimentaria (Polaska y Sokolowska, 2019). En los últimos años se ha reconocido ampliamente que los bacteriófagos tienen varias aplicaciones potenciales en esta industria. Se han propuesto como bioconservadores en alimentos y como herramientas para detectar patógenos a lo largo de la cadena alimentaria (García y col., 2008). Las aplicaciones en biocontrol basadas en bacteriófagos tienen un gran potencial para mejorar la inocuidad microbiana, basada en su fácil manejo, así como alta actividad antimicrobiana y especificidad (García y col., 2008). Los fagos se pueden aplicar en la industria alimentaria: desde la producción primaria, como biodesinfección y bioconservación (Polaska y Sokolowska, 2019). En la biodesinfección, los fagos o las enzimas que producen se utilizan principalmente para prevenir la formación de biopelículas en la superficie de los equipos utilizados en las instalaciones de producción (Polaska y Sokolowska, 2019). Los fagos también se pueden aplicar en la etapa de poscosecha, durante el procesamiento y empaque de alimentos, como bioconservadores, para controlar los patógenos (por ejemplo, en canales) y extender la vida útil de los alimentos manufacturados perecederos combatiendo las bacterias deterioradoras (García y col., 2008).

La aplicación de fagos en la cadena alimentaria tiene las siguientes ventajas:

- Son muy específicos y generalmente pueden infectar solo una especie o un tipo de bacteria. Por lo tanto, la microbiota comensal natural del tracto gastrointestinal de humanos y animales no se destruye.
- No se ha observado ningún efecto adverso o tóxico sobre las células eucariotas con el uso de bacteriófagos. Los bacteriófagos son ubicuos y están presentes en muchos productos alimenticios y en diferentes tipos de suelos y fuentes de agua.
- No cambian las propiedades sensoriales de los productos alimenticios.

- Son altamente resistentes al estrés creado durante el procesamiento de alimentos (Kazi y Annapure, 2016; Gilmore, 2012).

Los bacteriófagos utilizados adecuadamente son beneficiosos para controlar la calidad de los alimentos. Por ejemplo, en la industria láctea su alta especificidad permite utilizarlos para destruir bacterias patógenas que se encuentran en los productos lácteos (Polaska y Sokolowska, 2019), aunque pudieran tener un impacto negativo en los cultivos iniciadores, pero es por ello que se ha intentado utilizar enzimas específicas producidas por los bacteriófagos y así evitar afectaciones en los cultivos iniciadores (Polaska y Sokolowska, 2019). El uso de bacteriófagos en los alimentos parece ser tan eficaz como los antibióticos, pero más seguro y ecológico, por lo que pueden ser una herramienta eficaz y económica contra las bacterias patógenas y deterioradoras de los alimentos que podría coadyuvar a la meta de garantizar la seguridad alimentaria mundial y preservar la calidad de los productos alimentarios (Wittebole y col., 2014).

1.2.3 Aislamiento y detección

Los bacteriófagos son los organismos más abundantes en la biosfera y su abundancia y distribución se basa principalmente en la de sus organismos hospedadores. Su aislamiento es muy común en fuentes ambientales como el suelo, superficies terrestres, plantas y aguas residuales (Kasman & Porter, 2020). Los bacteriófagos se aíslan utilizando una mezcla de hospedadores con la intención de obtener fagos con un rango amplio de hospedadores (Hyman, 2019). Las pruebas puntuales de dilución única pueden sobreestimar tanto la virulencia en general como el rango de hospedadores, pero no se pueden utilizar para la identificación o selección de una mezcla de fagos, por lo que pueden sustituirse por pruebas de eficiencia de la siembra en placa (EOP) (Khan y Nilsson, 2015).

En muestras ambientales, se utilizan las pruebas de turbidez para detectar la presencia del fago de interés en una suspensión (Mohamed y col., 2016) y, por otro lado, la visualización de placas individuales permite mucho más que solamente la enumeración (Kropinski y col., 2009). La caracterización es la base para el

aislamiento de fagos y entre los métodos de caracterización está la determinación de la concentración funcional de partículas de bacteriófagos (título), generalmente expresada como unidades formadoras de placa (ufp) por mililitro y es el protocolo más utilizado para trabajar con fagos. Una variable de este método se denomina técnica de “recubrimiento de agar blando”, “agar doble capa” o “doble capa” e implica mezclar diluciones de suspensión de fagos con bacterias hospedadoras en un agar diluido o matriz de agarosa y distribuir esta mezcla en una placa de agar estándar para solidificar (Kropinski y col., 2009). Después de la incubación (generalmente durante la noche) las placas se visualizan como zonas de aclaramiento (o crecimiento disminuido) en el césped bacteriano (Kropinski y col., 2009).

En el Cuadro 1 se muestran algunos métodos para la detección de bacteriófagos. Cada uno de ellos tiene ciertas ventajas y limitaciones que dependen de la complejidad de la técnica, el costo, el tipo de bacteriófagos que se están buscando, así como los equipos y reactivos que se emplean.

Cuadro 1. Métodos para la detección de bacteriófagos.

| Método | Descripción |
|-------------------|--|
| Prueba localizada | Se colocan pequeñas gotas de filtrado de fagos en la superficie del césped bacteriano y después de la incubación, una zona de lisis indica la presencia de fagos. |
| Prueba en placa | Se mezclan diluciones crecientes del filtrado de fagos con bacterias y se colocan sobre la superficie de la placa mediante un recubrimiento de agar blando o extendido. Después de la incubación, se confirma la presencia de unidades formadoras de placa por los halos que se forman en el agar. |
| Cultivo de lisis | Se añade el filtrado del fago al caldo de cultivo de bacterias y se incuba. Se evidencia la lisis celular según lo indicado por la pérdida de turbidez del cultivo y pueden utilizarse tintes metabólicos en lugar de turbidez para evaluar la actividad metabólica bacteriana. |

| | |
|------------------------------------|---|
| Dilución de prueba de rutina (RTD) | Los lisados de fagos se diluyen hasta el punto de producir un poco menos que la lisis confluyente en una placa. Se realiza la dilución de fagos más baja que todavía puede formar una zona de lisis en su huésped de propagación. Este método es más sensible que detectar un lisado de fagos de alto título, ya que se requiere un nivel de infección de fagos productiva para producir una señal. |
|------------------------------------|---|

(Hyman, 2019)

I.2.4 Bacteriófagos en bebidas alcohólicas

En el caso del deterioro de la cerveza por *L. brevis*, la inducción de profagos representa un atributo beneficioso que podría aprovecharse como una alternativa natural a los compuestos químicos en la erradicación de las bacterias deterioradoras ya que se espera que la inducción de profagos provoque la lisis de las células bacterianas evitando así el desarrollo de organismos de deterioro en la industria cervecera. Hasta la fecha, se ha secuenciado y caracterizado el genoma de un solo fago templado de *L. brevis*, el fago LBR48 (Feyereisen y col., 2019). En otro estudio se obtuvieron datos preliminares a escala de laboratorio confirmando la presencia de bacteriófagos en tres variedades de uva distintas utilizadas en la fabricación de vino, y destacan la aplicación potencial de un “cóctel de fagos” que combina varios agentes infecciosos contra una bacteria específica. Para reducir la probabilidad de bacterias resistentes, se podrían diseñar cócteles que contengan fagos que utilicen diferentes receptores. De esa forma, si el mutante generara resistencia a uno de los fagos del cóctel, seguiría siendo sensible a los demás. Actualmente, el uso de bacteriófagos líticos es una alternativa creciente para el control biológico de patógenos en los alimentos y la industria alimentaria (Cordero-Bueso y col., 2020). En los Estados Unidos, se preparan regularmente varios cócteles de fagos aprobados por la FDA y la USDA para limitar o eliminar bacterias patógenas como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en los alimentos. Aunque no se han probado cócteles de fagos producidos para la cerveza, los fagos que infectan a las bacterias que deterioran la cerveza se encuentran fácilmente en el medio ambiente. Se podría

desarrollar fácilmente un cóctel de fagos a través de ensayos de placas, purificación, propagación, desarrollado a través de pruebas de campo, luego incorporado en procesos de elaboración de cerveza (Mollinger, 2019).

I.2.5 Caracterización

Uno de los desafíos para caracterizar un bacteriófago es la cantidad de hospedadores que se van a probar, es decir el rango de hospedadores, que se define como la especificidad de los bacteriófagos para infectar solamente un cierto tipo de bacterias. Para esto se han utilizado métodos de caracterización basados en la multiplicación de los bacteriófagos y algunos métodos utilizan únicamente pruebas puntuales menos precisas pero que son fáciles de realizar (Hyman, 2019). Los criterios para la caracterización de bacteriófagos pueden ser físicos, químicos, serológicos, de virulencia, entre otros (Ackerman, 2011). A continuación, se muestran algunos métodos para la caracterización de bacteriófagos en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Métodos utilizados para la caracterización de bacteriófagos.

| Método | Características de la metodología |
|---|--|
| Eficiencia de lisis celular (EOP) | La EOP se utiliza para determinar la virulencia de un bacteriófago y se realiza cuando se han aislado múltiples fagos, especialmente cuando se planea combinar fagos para hacer un cóctel (Hyman, 2019). La EOP se calcula dividiendo el título del fago en la dilución terminal en la cepa de prueba por el título del mismo fago en su cepa de aislamiento. Sobre esta base, los fagos se clasifican como altamente virulentos ($0.1 < EOP > 1.00$), moderadamente virulentos ($0.001 < EOP < 0.099$), avirulentos pero activos ($EOP < 0.001$) o avirulentos (no se detectan placas) (Gibson y col., 2019). |
| Morfología de fagos por microscopía electrónica | La microscopía electrónica de transmisión proporciona la base para el reconocimiento y establecimiento de familias de bacteriófagos, además es uno de los criterios esenciales para clasificar virus nuevos en familias. Permite ver la morfología y tamaño del virus; el |

| | |
|--|---|
| | <p>diagnóstico es instantáneo y es, por tanto, la técnica diagnóstica más rápida en virología (Ackermann, 2012).</p> |
| <p>Secuencia completa del genoma</p> | <p>Una secuenciación completa de genoma puede confirmar la falta de genes de toxinas, la capacidad de formar un lisógeno e identificar fagos relacionados para inferencias de algunas funciones genéticas. Analizando la secuencia se pueden detectar los marcos abiertos de lectura (ORF) y saber también el contenido GC para detectar el origen y el término de la replicación del genoma del fago (Dong y col., 2022).</p> |
| <p>Curva de crecimiento de un paso</p> | <p>La curva de crecimiento de un paso puede describir cuantitativamente el crecimiento característico de un fago y visualizar su período latente y tamaño de explosión. Esta curva se realiza infectando un cultivo de la cepa indicadora a la mitad de su fase logarítmica con el bacteriófago (Han y col., 2022). Se toman muestras del cultivo, se centrifugan y titulan por la técnica de vaciado en placa (Hyman, 2019).</p> |
| <p>Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)</p> | <p>Puede usarse para medir directamente el tamaño del genoma de un fago, determinar el peso molecular o para el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción cuando se han aislado múltiples fagos (Hyman, 2019).</p> |

II. OBJETIVOS

II.1 General

Aislar e identificar bacterias deterioradoras de cerveza y evaluar su susceptibilidad a bacteriófagos aislados del mismo ambiente de producción.

II.2 Específicos

- Aislar bacteriófagos y bacterias deterioradoras en ambientes de producción de cerveza y vino.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de los bacteriófagos aislados sobre células bacterianas en suspensión y adheridas.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de bacteriófagos seleccionados contra bacterias deterioradoras en cerveza tipo pilsner.
- Caracterizar los bacteriófagos mediante PCR.

III. METODOLOGÍA

III.1 Materiales más relevantes

III.1.1 Equipo

- Centrífuga METRIX® Velocity 14
- Termociclador BioRad®
- Cámara de electroforesis BIORAD®
- VarioskanFlash®

III.1.2 Medios de cultivo

- Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) Sigma Aldrich®
- Caldo Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) Sigma Aldrich®
- Agar GYC 1.5% (glucosa 5%, extracto de levadura 1%, CaCO₃ 0.5%, cicloheximida 0.01%)

- Caldo GYC (glucosa 5%, extracto de levadura 1%, CaCO₃ 0.5%, cicloheximida 0.01%) pH=0.68 ± 0.2
- Agar Soya Trypticasa (DIBICO®)
- Caldo Soya Trypticasa (DIBICO®)
- Extracto de levadura (DIBICO®)
- Caldo neutralizante (Bioxon®)

III.1.3 Soluciones

- H₂O₂ al 3%
- Buffer de fosfatos (PBS) 1x Sigma Aldrich®
- Buffer SM (0.05 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.01 M MgSO₄, pH = 7.5)
- Solución salina isotónica (SSI) 0.85%
- Cristal violeta al 1%
- Etanol al 95%
- Peptona de caseína 0.1% (DIBICO®)
- NaCl 1M (DIBICO®)

III.1.4 Reactivos

- Cicloheximida Sigma Aldrich®
- Glicerol (Meyer®)
- Tiras de oxalato de p-aminodimetilanilina (BioRad®)
- Ácido acético glacial al 33% (v/v) (Meyer®)
- Metanol (Meyer®)
- CaCO₃
- Dextrosa
- Polietilenglicol 8000 (NEOGEN®)
- MgSO₄

III.2 Métodos

III.2.1 Aislamiento de bacterias deterioradoras

Se realizaron ocho muestreos de los cuales seis se hicieron en tres empresas cerveceras distintas (una de ellas en Morelia y dos en la ciudad de Querétaro) y dos más en una bodega vinícola localizada en el estado de Querétaro. En las cerveceras se tomaron muestras de tanques fermentadores, barricas, válvulas, mangueras, enlatadoras, intercambiadores, piso, coladera, e incluso de materia prima como el centeno. En la bodega los sitios muestreados fueron: cajas con botellas de vino, despalilladora, tótem de almacenamiento del producto terminado, prensa, coladera, barricas, llaves y mangueras de tanques, agua y filtros. Para la recolección de muestras se utilizaron hisopos y esponjas estériles sumergidos en 2 y 20 mL de caldo neutralizante. Estas muestras se resguardaron en contenedores estériles dentro de una hielera con paquetes de gel refrigerante y se trasladaron al laboratorio para su procesamiento.

Para todos los casos se realizaron diluciones decimales con peptona de caseína 0.1% de 10^{-1} hasta 10^{-6} y se sembraron por extensión en superficie. Para el aislamiento de BAL se utilizó el agar MRS y para las BAAC se empleó agar GYC suplementado con cicloheximida al 0.01 %. También se realizó el aislamiento de *Bacillus* con agar AST ya que, si bien esta cepa creció en MRS, su morfología se observó mejor en AST. Para todos los casos se realizaron diluciones con peptona de caseína al 0.1 % de 10^{-1} hasta 10^{-6} y se sembraron por extensión en superficie. Estas placas se dejaron incubar 30 °C / 24 h para BAL y *Bacillus* y 25 °C / 48 h para BAAC. Posteriormente se realizaron 3 pases para la purificación de las cepas con su morfología característica y en su medio correspondiente: GYC para BAAC y MRS para BAL.

III.2.2 Identificación de bacterias deterioradoras

Para la identificación de BAL, BAAC y *Bacillus* se determinó la actividad de la enzima catalasa, para lo cual se colocó una porción de la colonia aislada sobre un

portaobjetos limpio y seco al que se le añadieron dos gotas de H₂O₂ al 3 %. También se realizó una tinción Gram y pruebas de oxidasa con tiras de oxalato de p-aminodimetilanilina. Las cepas con características específicas de BAL, BAAC y *Bacillus* se almacenaron a -20 °C en tubos Eppendorf con caldo MRS, GYC o CST y 20 % de glicerol.

III.2.3 Activación de cepas bacterianas

Se transfirieron 40 µl de las cepas de aisladas (BAL, BAAC y *Bacillus*) conservadas con glicerol (III.2.2) a un tubo con 5 mL de caldo MRS, GYC o CST, respectivamente. Se incubaron a 30 °C / 48 h las BAL y el *Bacillus*, y a 25 °C / 48 h las BAAC.

III.2.4 Evaluación de la capacidad de deterioro de las cepas

Con el objetivo de identificar las potenciales cepas deterioradoras, se evaluó cada cepa inoculando cada una en 10 mL de cerveza clara pasteurizada comercial tipo pilsner (previamente desgasificada) y se midió la turbidez a 600 nm durante una semana a 25 °C. Las cepas que mostraron un aumento en la turbidez fueron las que se eligieron para el estudio posterior; en este subsecuente estudio se utilizó un volumen de 100 mL de cerveza clara pasteurizada comercial tipo pilsner (previamente desgasificada) y las cepas seleccionadas se inocularon nuevamente en la cerveza a una concentración de $\sim 10^{-4}$ UFC/mL y se almacenaron a 25 ± 2 °C durante cuatro semanas. Cada semana se midió la turbidez a 600 nm, el pH y acidez en cada una de las muestras. De manera paralela se cuantificaron las poblaciones de BAL, BAAC y *Bacillus* en agar MRS, GYC y AST, respectivamente mediante extensión en superficie. Al final del periodo de estudio se realizó una evaluación sensorial de aroma mediante una prueba discriminatoria con la participación de 10 panelistas no entrenados para cada una de las bebidas inoculadas con las cepas. Se empleó el formato que se muestra en la Figura 1 y las diferencias se estimaron mediante un análisis estadístico. El consentimiento informado que se proporcionó a los panelistas se incluye en el Anexo 1. Los ensayos de todos los parámetros de deterioro se realizaron por triplicado. Como prueba complementaria se realizó una

detección de aminas biogénicas para las BAL seleccionadas como potencialmente deterioradoras (Marmolejo, 2021).

Figura 1. Formato de evaluación sensorial para la prueba de control-diferencia.

| | | | | | |
|---|---------------|-----------------------------|-------|----------------|--|
| Participante: _____ | | Fecha: _____ | | Prueba # _____ | |
| Instrucciones | | | | | |
| 1. Huela primero el frasco marcado como "Control". | | | | | |
| 2. Espere 5 segundos y huela una de las muestras marcadas con el código de tres dígitos. | | | | | |
| 3. Indique en las líneas de la escala con una "x" si encontró diferencia con respecto al control. | | | | | |
| 4. Repita el proceso hasta finalizar las muestras a evaluar. | | | | | |
| | ESCALA | MARQUE LA DIFERENCIA | | | |
| NO DIFERENCIA | 0 | _____ | _____ | _____ | |
| | 1 | _____ | _____ | _____ | |
| | 2 | _____ | _____ | _____ | |
| | 3 | _____ | _____ | _____ | |
| | 4 | _____ | _____ | _____ | |
| | 5 | _____ | _____ | _____ | |
| | 6 | _____ | _____ | _____ | |
| | 7 | _____ | _____ | _____ | |
| | 8 | _____ | _____ | _____ | |
| | 9 | _____ | _____ | _____ | |
| EXTREMADAMENTE DIFERENTE | 10 | _____ | _____ | _____ | |
| RECUERDE QUE SE ENCUENTRA UN CONTROL DUPLICADO EN LAS MUESTRAS. | | | | | |
| COMENTARIOS: _____ | | | | | |
| _____ | | | | | |
| _____ | | | | | |

Una vez que las cepas se seleccionaron como deterioradoras por generar turbidez en la cerveza y generar cambios sensoriales, se realizó una PCR múltiple para identificar las diferentes especies de BAL (Petri y col., 2013), utilizando los iniciadores SCAR (Marmolejo, 2021). Para la identificación de las cepas deterioradoras se hizo una amplificación del ADN ribosomal 16S utilizando los (16Sd, 5'-GCTGGCGGCATGCTTAACACAT-3') y reversa (16Sr, 5'-

GGAGGTGATCCAGCCGCAGGT-3') que amplificaron de la posición 20 a la 1507 tanto para las cepas de BAL como para las cepas de BAAC y *Bacillus*. Los fragmentos se enviaron a secuenciar en MacroGen (<https://dna.macrogen.com/>) para posteriormente contrastar con la base de datos del GenBank, mediante la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las cepas de BAL obtenidas se almacenaron en caldo MRS, las de BAAC en caldo GYC (glucosa 1 % y extracto de levadura 1 %) y las de *Bacillus* en CST, todas con 20% de glicerol a -20 °C.

III.2.5 Obtención de bacteriófagos en aguas residuales y superficies

III.2.5.1 Recolección de muestras

Se recolectaron un total de 17 muestras (9 en bodega vinícola y 8 en una cervecería artesanal) a partir de superficies como enlatadora, tanque de fermentación, intercambiador, despalilladora, coladera, barricas y materia prima. Las muestras líquidas se recolectaron en tubos falcon de 50 mL en los sitios donde se obtuvieron cepas bacterianas (III.2.1). Para el muestreo de superficies como las coladeras se utilizaron hisopos para hendiduras y superficies pequeñas, y esponjas para superficies planas y amplias. Se realizó la recolección de la muestra frotando con el hisopo en un patrón de zig-zag superpuesto dos veces sobre el área, la segunda vez perpendicular a la primera dirección de barrido. El hisopo se colocó en un tubo de ensayo con 2 mL de caldo neutralizante. La esponja se usó en al menos 100 cm² de la superficie con un procedimiento similar a lo descrito con el hisopo y se colocó en 50 mL de caldo neutralizante en una bolsa estéril.

III.2.5.2 Enriquecimiento y aislamiento de los bacteriófagos

Todas las muestras se sometieron a centrifugación a 3000 g / 3 min. El sobrenadante se pasó a través de una membrana de acetato de celulosa (0.22 µm) para eliminar las células bacterianas. Para el enriquecimiento de bacteriófagos, se utilizaron 5 mL de cada cepa activada de BAL, BAAC y de *Bacillus* (III.2.3) a las cuales se les adicionó 1 mL del sobrenadante, y se incubaron a 30 °C / 24h (BAL y *Bacillus*) y 25

°C / 48 h para las BAAC. Después del enriquecimiento, las células bacterianas se centrifugaron a 3000 g / 3 min y el sobrenadante se hizo pasar a través de la membrana de acetato de celulosa. Estas suspensiones de bacteriófagos se emplearon para las etapas de detección, cuantificación y purificación.

III.2.6 Detección y cuantificación de bacteriófagos

Se realizó la detección de los bacteriófagos mediante una prueba de puntos para evaluar su rango de huésped. Esta prueba consistió en utilizar 3 mL de agar (MRS, GYC o AST de acuerdo con la cepa utilizada) al 0.6 %, en este agar se adicionaron 500 µl de la cepa a evaluar a una concentración de $\sim 10^{-8}$ UFC/mL y se homogeneizó la mezcla para posteriormente distribuirla en la placa con el agar base; una vez seco el agar suave (0.6%) la placa se marcó como se muestra en la Figura 2 y en cada espacio se adicionaron 10 µl del bacteriófago. Las placas se incubaron a 25 °C para BAAC y a 35 °C para BAL y *Bacillus* durante 24 h.

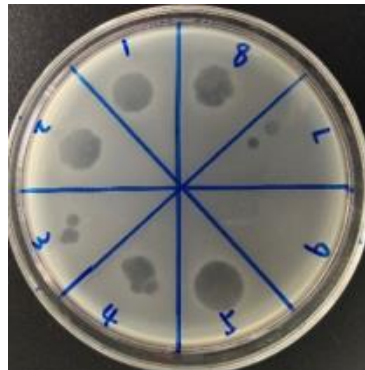


Figura 2. Ejemplo de la aplicación de la prueba de puntos.

Posteriormente se cuantificaron los bacteriófagos más eficientes mediante la técnica de agar doble capa. Para esto, se mezclaron 100 µl de las cepas aisladas y activadas sin diluir (III.2.3) con 3 mL de agar MRS, GYC o AST al 0.6 %, también se adicionaron 100 µl de suspensión de bacteriófagos (IV.2.4.2); esta mezcla se vertió sobre el mismo medio sólido y se incubó a 30 °C / 24 h (BAL y *Bacillus*) y 25 °C / 48 h (BAAC). Pasado el tiempo de incubación se contaron los halos de inhibición y se obtuvieron las UFP/mL, obteniendo el título de cada uno de los fagos.

Posteriormente se realizó una amplificación de tres pasos (Li y col., 2020), que consistió en lo siguiente:

Paso 1: A partir de una placa de agar con el bacteriófago purificado se tomó una pequeña parte del halo de inhibición con un palillo de dientes estéril y se adicionó a un tubo con 3 mL de caldo (MRS para bacteriófagos de BAL, CST para bacteriófagos de *Bacillus* y GYC para bacteriófagos de BAAC) suplementado con CaCl_2 1 mM y al cual se le agregaron 30 μl de la cepa huésped a $\sim 10^{-8}$ UFC/mL. Este tubo se incubó a 200 rpm durante 3h a la temperatura de desarrollo de la cepa y posteriormente se centrifugó a 10,000 g / 1 min, el sobrenadante se filtró con una membrana de 0.22 μm y se resguardó como sobrenadante 1.

Paso 2: Por otro lado, se adicionaron 30 μl de la cepa huésped $\sim 10^{-8}$ UFC/mL a un tubo con 3 mL de caldo correspondiente y se dejó 1h / 200 rpm a la temperatura de desarrollo de la cepa; una vez pasado este tiempo se agregaron 100 μl del sobrenadante 1 y se dejó incubando a la temperatura de desarrollo de la cepa huésped durante 6 h / 200 rpm, pasado este tiempo se realizó una centrifugación a 10,000 g / 1 min y se filtró el sobrenadante con una membrana de 0.22 μm y se resguardó como sobrenadante 2.

Paso 3: Se utilizaron 500 μl de la cepa huésped $\sim 10^{-8}$ UFC/mL en 50 mL del caldo correspondiente suplementado con CaCl_2 1 mM, se incubó 1h / 200 rpm a la temperatura de desarrollo de la cepa y se adicionó el sobrenadante 2. Esta mezcla se incubó toda la noche a 200 rpm y se centrifugó a 10,000 g / 20 min a 4 °C y se filtró con una membrana de 0.22 μm siendo este el sobrenadante 3; a este sobrenadante se le adicionó 10% de PEG 8000 y NaCl 1 M y se colocó en un baño de hielo durante 4 h, pasado este tiempo nuevamente se centrifugó a 10,000 g / 20 min a 4 °C y el precipitado se re suspendió en 2 mL de agua ultra pura y se almacenó a 4 °C.

III.2.7 Evaluación del efecto antimicrobiano de los bacteriófagos aislados sobre bacterias deterioradoras en suspensión y adheridas.

Para la evaluación del efecto de los bacteriófagos en las células en suspensión, cultivos activados de las cepas individuales de BAL y *Bacillus* aisladas anteriormente (III.2.1) se diluyeron con peptona 0.1 % hasta obtener una concentración de $\sim 10^{-8}$ UFC/mL. Se inoculó una concentración de $\sim 10^{-5}$ UFP/mL de la suspensión de bacteriófagos y se incubaron a 30 °C / 24 h. Una vez finalizado el tiempo, la suspensión se centrifugó a 3000 g / 3 min, se recuperó el sobrenadante y el paquete celular se lavó y re suspendió con peptona 0.1 % para cuantificar las células sobrevivientes en agar MRS y AST. Se utilizaron las cepas bacterianas sin la presencia de bacteriófagos como controles.

Para la evaluación del efecto de los bacteriófagos sobre células adheridas en acero inoxidable se empleó una suspensión de $\sim 10^7$ UFC/mL de BAL en caldo MRS y $\sim 10^5$ UFC/mL de *Bacillus* en CST. En estas suspensiones se depositaron 16 esferas de acero inoxidable (2.5 mm de diámetro) previamente esterilizadas y se incubaron a 30 °C / 6 h. Las esferas se lavaron en tres ocasiones con SSI al 0.85% y se colocaron en una suspensión de PBS con bacteriófagos a una concentración de 10^5 UFP/mL durante 24 h. Las esferas se recuperaron y se lavaron tres veces con SSI, posteriormente las células adheridas se removieron con el vórtex a velocidad máxima durante 2 min y se cuantificaron en agar MRS y AST incubando a 30 °C durante 24 h. El experimento se hizo por triplicado y se realizó un ANOVA y una prueba de Dunnett. Se incluyó un control de las bacterias no expuestas al bacteriófago en los diferentes tiempos y se estimó la reducción lograda con la aplicación del bacteriófago.

III.2.8 Evaluación del efecto antimicrobiano de bacteriófagos seleccionados en cerveza pilsner.

Los ensayos se realizaron en 100 mL de cerveza clara pasteurizada comercial tipo pilsner (Carta Blanca), que se desgasificó previamente y a la cual se le añadió un inóculo de 100 μ l a una concentración de 10^{5-7} UFC/mL de las cepas de BAL

previamente activadas (IV.2.3) y 10^5 UFP/mL de los fagos correspondientes, teniendo un control para cada cepa, que consistió en 100 mL de la cerveza inoculada con BAL y *Bacillus* sin bacteriófagos, así como 100 mL de cerveza sin ningún microorganismo. La cerveza inoculada y los controles se almacenaron a 25 ± 2 °C durante cuatro semanas. Cada semana se midió la turbidez a 600 nm, el pH y acidez en cada una de las muestras. De manera paralela se cuantificaron las poblaciones de BAL y *Bacillus* en agar MRS y AST, respectivamente mediante extensión en superficie; así como la concentración de los bacteriófagos. Al final del periodo de estudio se realizó una evaluación sensorial de aroma mediante una prueba discriminatoria con la participación de 10 panelistas no entrenados para cada una de las cepas. Se empleó el formato que se muestra en la Figura 1 y se proporcionó el consentimiento informado que se proporcionó a los panelistas se incluye en el Anexo 1. Los ensayos de todos los parámetros de deterioro se realizaron por triplicado. Los bacteriófagos se caracterizaron Se evaluaron las diferencias en la actividad de los bacteriófagos en la matriz alimentaria con cada una de las cepas utilizadas mediante un ANOVA y comparación de medias por la prueba de Tukey.

III.2.9 Caracterización de bacteriófagos específicos de BAL y *Bacillus* mediante PCR.

La extracción de ADN de los bacteriófagos se realizó con el protocolo de fenol: cloroformo (Centro de Tecnología de Fagos de la Universidad de Texas A&M, 2022). El bacteriófago de *Bacillus* y los bacteriófagos que presentaron mayor actividad sobre BAL se caracterizaron mediante PCR utilizando los iniciadores que se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Iniciadores de bacteriófagos para PCR.

| Gen | Familia | Dirección del iniciador | Nombre del iniciador | Secuencia 5´-3´ | Tamaño del amplicón |
|------|------------|-------------------------|----------------------|----------------------------|---------------------|
| Gp23 | Myoviridae | F | Mzia1 | GATATTTGIGGIGTTCAGCCCIATGA | |

| | | | | | |
|--------|--------------|---|--------|---|-----------------|
| | | R | Mazia2 | CGCGGTTGATTTCCAGCATGATTTTC | 380 - 600 bp |
| Pun45 | Myoviridae | F | PUN45 | AACGAACAGCGCCTTGAC | 140 bp |
| Pun45 | | R | PUN45 | CCAGTTGCAGCCAGTGTG | |
| STS3 | Podoviridae | F | STS3 | GACAAACAAGAACGCGGCAACTGA | 96 bp |
| STS3 | | R | STS3 | ATACCCAGCAAGGCGTCAACCTTA | |
| SmpilA | Siphoviridae | F | SmpilA | GTATGTCGACGCCAATCGCCCCTATGCT GG | 11146 bp |
| SmpilA | | R | SmpilA | ATGGGATTAGCAGCCAGAGCACAGGATC GGTCTGG | |

Posteriormente se utilizaron las condiciones de PCR y visualización de los productos específicos para cada iniciador (Cuadro 4).

Cuadro 4. Condiciones de PCR para iniciadores de bacteriófagos.

| Gen | Condiciones de PCR |
|--------------------|---|
| Gp23 | Se agregaron 2 µl de cada iniciador a una mezcla de PCR de 48 µl que contenía un tampón de TaqDNA polimerasa (50 mM KCl/20 mM Tris-HCl, pH 8.4), 1.5 mM MgCl ₂ , una concentración de 0.20 mM de cada desoxirribonucleósido trifosfato, 40 pmol de cada uno de los iniciadores y 1.0 unidades de Taq polimerasa (New England Biolabs). Los controles negativos contenían todos los reactivos y agua estéril sin el iniciador. Las PCR se realizaron con los siguientes parámetros del ciclo: desnaturalización a 94 °C durante 90 s, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 s, hibridación a 50 °C durante 1 min, extensión a 72 °C durante 45 s y una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en agarosa al 2 % en Tris-acetato-EDTA 0.5x, pH 8.0, a 100 V durante 60 min. |
| Pun45 & STS3 | Las reacciones de PCR multiplex en tiempo real estuvieron compuestas de 25 µl en tampón ThermoPol 10X (NEB, Ipswich, MA), 0.2 mM de cada iniciador, 0.1 mM de sonda, 0.2 mM de cada trifosfato de desoxirribonucleótido (dNTP), 2 mM MgCl ₂ , 1.3 U Taq polimerasa (NEB) o 2X Master Mix (Qiagen) y 2 µl de muestra suspendida en PB. Los ciclos consistieron en: 95°C, 5 min y 45 ciclos de 95 °C, 10 s, 60 °C, 16 s). |

| | |
|--------|---|
| SmpilA | La mezcla de PCR contenía 50 ng de ADN genómico de D1585, 0.5 μ M de cada iniciador, dNTP 0.2 mM, DMSO al 3 % y tampón GC 1X (New England Biolabs, Mississauga, ON, Canadá) en agua miliQ estéril y se calentó durante 3 min a 98 °C antes de añadir 1 U de ADN polimerasa Phusion de alta fidelidad (New England Biolabs) por reacción. Las reacciones se procesaron durante 35 ciclos de 15 s a 98 °C, 30 s a 57.4 °C para D1585 o 66.7 °C para 280 y 30 s a 72 °C antes de una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR se purificaron utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Inc., Germantown, MD, EE. UU.). |
|--------|---|

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Aislamiento e identificación de BAL y BAAC.

Durante los ocho muestreos se recolectaron 66 muestras y se aislaron 75 cepas bacterianas, de las cuales 13 se identificaron como BAL (Cuadro 5) al ser Gram positivas y catalasa y oxidasa negativa (Ni y col., 2015). Dos cepas tuvieron una morfología de cocos y el resto de bacilos. En un estudio realizado en Australia, se describió la incidencia de BAL en cerveza artesanal embotellada, un total de 80 cervezas de 19 cervecerías fueron examinados en busca de BAL y el 30% contenía BAL cultivables (Menz y col., 2010).

Cuadro 5. Cepas bacterianas identificadas.

| Tipo de bacteria | Identificación por secuenciación y *PCR | Origen | Sitio de muestreo |
|------------------|---|-----------------|-------------------|
| BAL-1 | NA | Bodega vinícola | Coladera |
| BAL-2 | NA | Bodega vinícola | Tanque |
| BAL-3 | NA | Bodega vinícola | Tótem |
| BAL-4 | NA | Bodega vinícola | Tótem |
| BAL-5 | <i>Leuconostoc citreum</i> | Bodega vinícola | Caja |
| BAL-6 | * <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | Cervecería | Coladera |
| BAL-7 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> | Cervecería | Coladera |
| BAL-8 | NA | Cervecería | Enlatadora |
| BAL-9 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> | Cervecería | Enlatadora |
| BAL-10 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> * <i>Lactobacillus plantarum</i> | Cervecería | Tanque |
| BAL-11 | NA | Cervecería | Piso |
| BAL-21 | NA | Cervecería | Tanque |

| | | | |
|---------|------------------------|-----------------|----------------|
| BAL-25 | NA | Cervecería | Mosto |
| BAAC-12 | NA | Cervecería | Enlatadora |
| BAAC-13 | <i>Bacillus cereus</i> | Cervecería | Válvula |
| BAAC-14 | NA | Cervecería | Manguera |
| BAAC-15 | NA | Cervecería | Manguera |
| BAAC-16 | NA | Cervecería | Manguera |
| BAAC-17 | NA | Cervecería | Manguera |
| BAAC-18 | NA | Cervecería | Intercambiador |
| BAAC-19 | NA | Cervecería | Fermentación |
| BAAC-22 | NA | Cervecería | Enlatadora |
| BAAC-20 | NA | Bodega vinícola | Llave |
| BAAC-23 | NA | Bodega vinícola | Tótem |
| BAAC-24 | NA | Bodega vinícola | Coladera |

*Cepas identificadas mediante PCR multiplex para BAL.

Se logró aislar 12 cepas con características de BAAC (Cuadro 5), siendo Gram negativas, catalasa positivas y oxidasa negativas, con forma de bacilos (Paradh y Hill, 2016). Las cepas se encontraron en lugares donde los procesos de limpieza son difíciles, como tanques y dispensadores de cerveza. Con esto se fomenta la persistencia de microorganismos, los cuales pueden llegar al producto terminado y contaminarlo (Feyereisen y col., 2019). Las cepas que no fueron identificadas es porque no cumplían con las características de BAL, BAAC o *Bacillus*. El ácido acético influye en el sabor de la cerveza de manera drástica, ya que se describe como áspero, y por lo tanto aporta una fuerte acidez y notas avinagradas si está presente por encima del umbral de concentración de alrededor de 200 mg/L y este algunas veces causa problemas en las cervezas no ácidas o cuando está presente en

concentraciones excesivamente altas en las cervezas ácidas causado por la presencia de BAAC (Bouchez y col., 2022).

El agar MRS es usado para poder aislar cepas de *Pediococcus* y *Lactobacillus* (Taroub y col., 2019). De las superficies muestreadas, se aislaron BAL principalmente de las coladeras (23%), seguido de los tótems de la bodega vinícola (15%), de los tanques de fermentación de la cervecería (15%) y de la enlatadora (15%). Las BAAC se obtuvieron mayormente de la manguera de los tanques de fermentación en la cervecería (33%) y esto concuerda con estudios que demuestran que las BAAC se encuentran principalmente en los tanques de fermentación (Bartowsky, 2009), mientras que las BAAC están presentes durante todas las etapas de la elaboración del vino e incluso pueden sobrevivir en condiciones anaerobias o semi-anaerobias (Osborne, 2010). El agar GYC es uno de los medios más comunes para el aislamiento de especies como *Acetobacter* y *Gluconoacetobacter* (Hommel, 2014) y a pesar de que no hay reportes en donde sea un medio propicio para el desarrollo óptimo de *B. cereus*, este cuenta con una concentración de glucosa del 5% que al ser una azúcar es un componente base del agar selectivo de *B. cereus*; la habilidad de este patógeno para producir endosporas explica su presencia ubicua en el entorno natural, así como su presencia en varios tipos de productos alimenticios crudos y procesados (Gheraldi y col., 2002).

Con la PCR multiplex para BAL se identificó una cepa de *Lc. mesenteroides* (BAL-6) confirmada por secuenciación y una cepa de *Lb. plantarum* (BAL-10) que en la secuenciación se identificó como *Lactiplantibacillus pentosus*. De las 25 cepas que se mandaron a secuenciar, solamente se lograron identificar seis de ellas (Cuadro 3) y una cepa que presentaba las mismas características morfológicas y bioquímicas de las BAAC que fue identificada como *B. cereus* (BAAC-13).

IV.2 Capacidad de deterioro de cepas seleccionadas.

Al evaluar la capacidad de deterioro de las cepas en la prueba preliminar se determinó que *Lc. citreum*, (BAL-5), las cepas de *Lb. pentosus* (BAL-7) y (BAL-9), la cepa BAL-8 y *B. cereus* eran potenciales deterioradoras al aumentar la DO en

cerveza a las 48 h; por lo que se procedió a realizar la prueba final de deterioro con 100 mL de cerveza en la cual una cepa de *Lb. pentosus* 7 (BAL-7) y *Lb. pentosus* (BAL-9) disminuyeron su población bacteriana en menos de 1 log UFC/mL a los 14 días de almacenamiento; por lo que no se consideraron para estudios posteriores. *Lc. citreum* (BAL 5), *B. cereus* y *Lb. pentosus* 9 (BAL-9) mostraron capacidad para sobrevivir en cerveza durante 21 días (Figura 3).

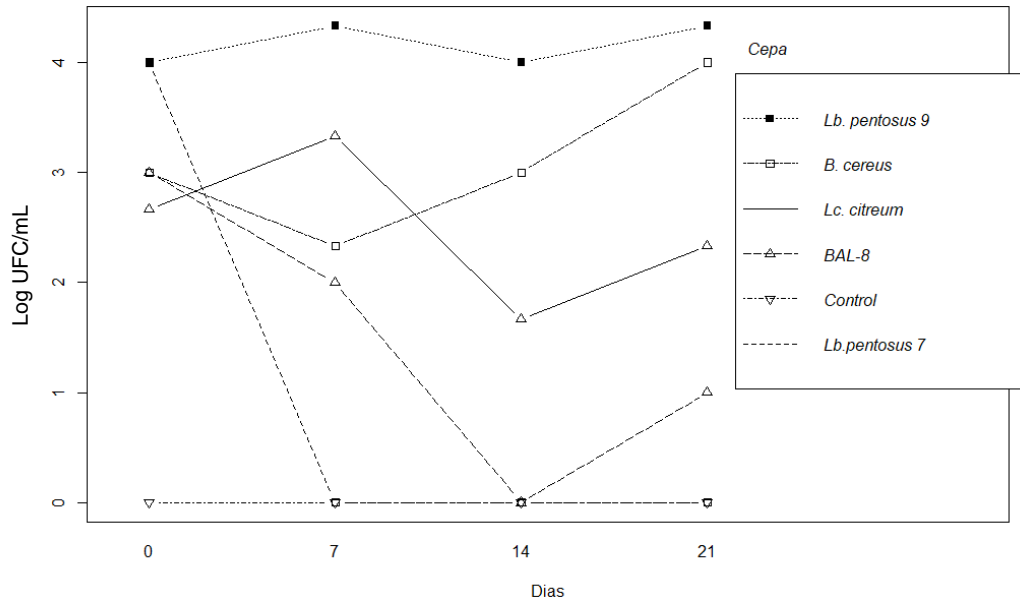


Figura 3. Comportamiento de BAL y *B. cereus* en cerveza pilsner almacenada a 25 °C durante 21 días. Cada punto representa la media de tres datos obtenidos de tres réplicas biológicas.

Debido a que en general la cerveza tiene un alto contenido de alcohol y acidez, así como un pH bajo, no hay especificaciones oficiales respecto a los criterios microbiológicos. Sin embargo, algunos autores sugieren un límite de tolerancia para contaminantes microbianos en cerveza de 0 – 50 UFC/mL por cada 100 – 200 mL de cerveza (Latorre et al., 2022) y este límite fue superado por la concentración de las cepas de *B. cereus* y de *Lb. pentosus* 9 (BAL-9) a los 21 días de ser inoculadas (10^4 UFC/mL); este aumento en la población bacteriana es debido a la adaptación que tuvo esta cepa. En la Figura 4 se muestra el comportamiento de las bacterias

deterioradoras en la cerveza. La DO medida a 600 nm se incrementó discretamente. *Lb. pentosus* (BAL-9) fue la cepa que aumentó más la DO y superó 0.1 unidades, lo que indica que tiene potencial de proliferación en la cerveza a temperatura ambiente (25 °C), de manera similar *B. cereus* tuvo un aumento significativo del día 14 al 21 con 0.02 unidades. *Lb. pentosus* (BAL-7), *Lc. Citreum* (BAL-5) y BAL-8 no tuvieron un aumento en DO que impactara directamente en la turbidez de la cerveza.

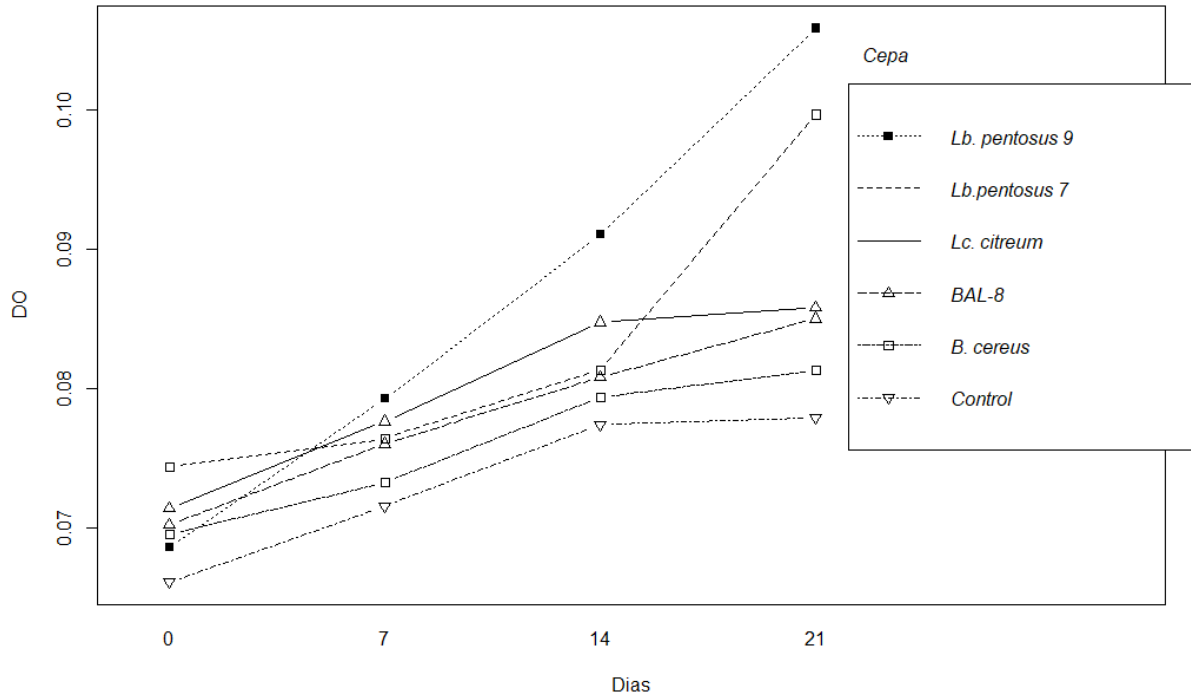


Figura 4. Densidad óptica en cerveza pilsner inoculada con BAL y *B. cereus* almacenada a 25 °C por 21 días. Cada punto representa la media de tres datos obtenidos de tres réplicas biológicas y tres mediciones de DO por cada réplica.

El pH de la cerveza disminuyó en todos los tratamientos, incluido en control (Figura 5). Sin embargo, la mayor disminución la realizó *Lb. pentosus* (BAL 9) con 0.5 unidades de reducción en el pH. Las demás cepas que se muestran en la Figura 5 realizaron una disminución en el pH estadísticamente distinto al control, sin embargo,

en cuestiones prácticas esto no modifica la percepción del aroma en la cerveza fresca (Guyot-Declerck, 2005).

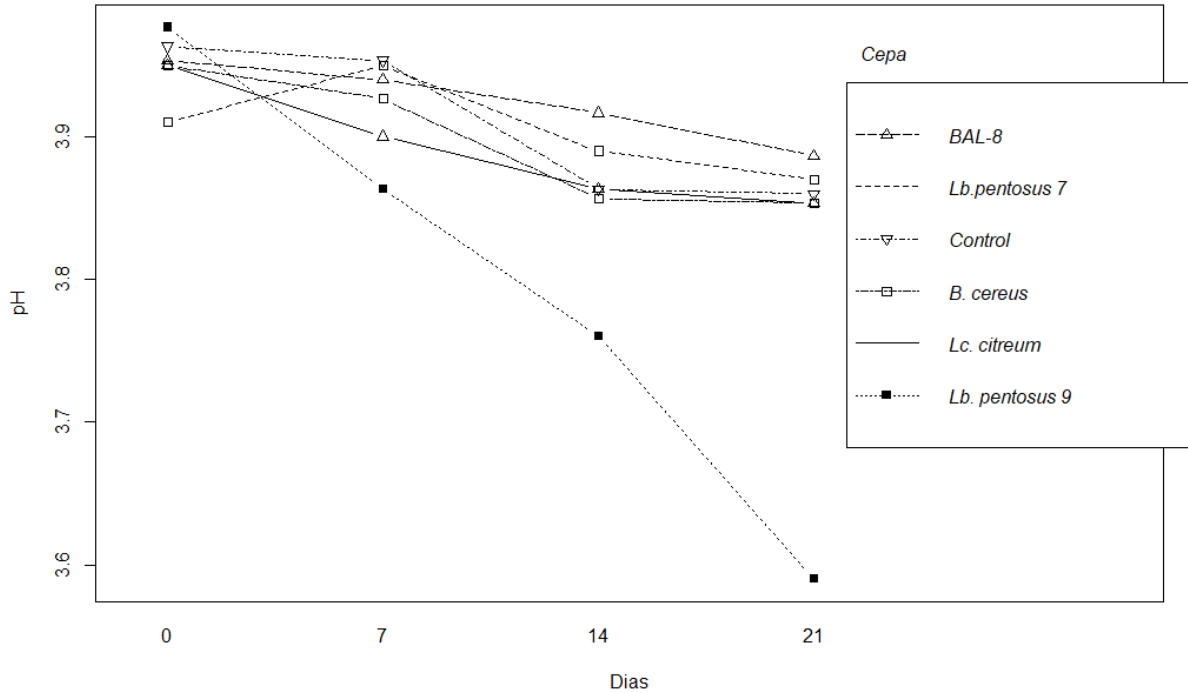


Figura 5. Nivel de pH en cerveza pilsner inoculada con BAL y *B. cereus* almacenada a 25 °C por 21 días. Cada punto representa la media de tres datos obtenidos de tres réplicas biológicas.

La turbidez es un factor importante que puede asociarse al deterioro de una cerveza, y este puede ser causado por las bacterias con capacidad para desarrollar en cerveza (Yu y col., 2019). El ANOVA arrojó diferencias estadísticas (Figura 6) y con la prueba de Dunnett se corroboró que el pH de la cerveza inoculada con las cepas es diferente al del control (pH de la cerveza sin inocular).

```

> modcovci<-aov(pH~Dias*Cepa, data=data) # con interacción
> summary(modcovci)

```

| | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F) | |
|-----------|----|--------|---------|---------|----------|-----|
| Dias | 1 | 0.1895 | 0.18952 | 62.118 | 7.81e-11 | *** |
| Cepa | 5 | 0.1243 | 0.02486 | 8.148 | 6.42e-06 | *** |
| Dias:Cepa | 5 | 0.1217 | 0.02433 | 7.976 | 8.17e-06 | *** |
| Residuals | 60 | 0.1831 | 0.00305 | | | |

```

---
signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Figura 6. ANOVA del pH en cerveza pilsner inoculada con BAL y *B. cereus* almacenada a 25 °C por 21 días.

Las BAL son un grupo de bacterias que principalmente producen ácido láctico a partir de la degradación de azúcares, suelen ser tolerantes a niveles bajos de pH, producen polímeros y generan sus características biopelículas que favorecen su persistencia en ambientes de producción de alimentos donde otras bacterias suelen estar inhibidas (Ferrero y col., 2021). Las cepas evaluadas al sobrevivir en estas condiciones de pH indica que pueden preservar el gradiente de pH transmembranal y prevenir la acidificación intracelular necesaria para la absorción de nutrientes (Yu y col., 2019).

Si bien el pH se modificó sutilmente en las cepas, estas diferencias pudieron ser debidas a la disolución del dióxido de carbono que pasó a ácido carbónico (Mollinger, 2019) ya que al inicio del experimento se desgasificó la cerveza pero al ser un proceso manual, quedó dióxido de carbono presente que con el paso de los días se fue disolviendo.

Con respecto al ANOVA de la acidez (Figura 7), este análisis arrojó que la acidez de la cerveza inoculada con cepas es igual a la acidez de la cerveza que no se inoculó.


```

---
Signif. codes:  0 '****' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> modcovci<-aov(Acidez~Dias*Cepa, data=data) # con interacción
> summary(modcovci)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Dias   1 3.640e-09 3.638e-09  1.791  0.186
Cepa   5 6.540e-08 1.308e-08  6.439 8.30e-05 ***
Dias:Cepa 5 9.105e-08 1.821e-08  8.964 2.51e-06 ***
Residuals 57 1.158e-07 2.032e-09
---
Signif. codes:  0 '****' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Figura 7. ANOVA de la acidez en cerveza pilsner inoculada con BAL y *B. cereus* almacenada a 25 °C por 21 días.

Solamente *B. cereus* realizó un cambio en la acidez de la cerveza (Figura 8), sin embargo este cambio al ser de 0.024 % no resultó significativo, al igual que el resto de las BAL. Si bien estadísticamente el pH tuvo una reducción en la cerveza pero la acidez no mostró cambios, esta discrepancia puede ser debida a la limitación que se tiene en la cuantificación de la titulación ácido-base ya que esta técnica no es tan precisa como lo es un potenciómetro para medir el pH, además de que los cambios observados en ambos parámetros fueron muy pequeños. Se sabe que en algunos incidentes de deterioro en cerveza han estado implicadas bacterias que pertenecen al género *Bacillus* y *Enterobacter*, los cuales causan acidificación y turbidez (Yu y col., 2019).

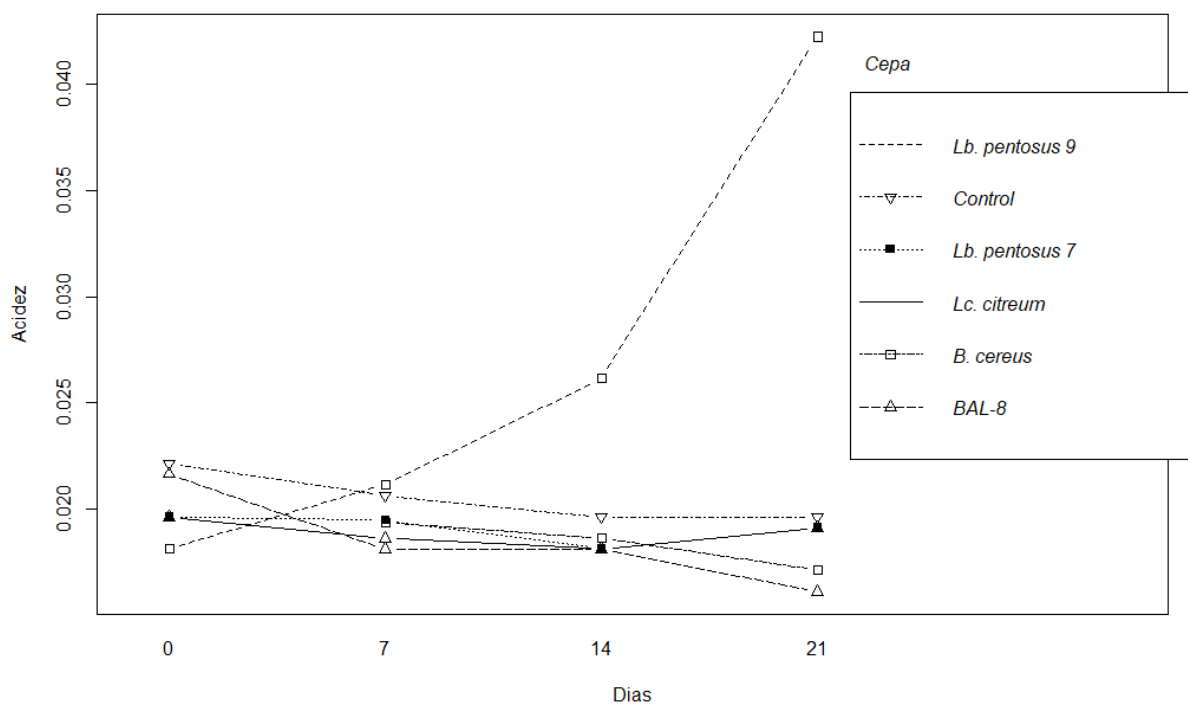


Figura 8. Acidez (expresada en eq/ml) en cerveza pilsner inoculada con BAL y *B. cereus* almacenada a 25 °C por 21 días. Cada punto representa la media de tres datos obtenidos de tres réplicas biológicas.

En el 2006, se reportó un alto porcentaje de productos alimenticios fermentados tradicionales en Corea (32 - 76%) contaminados con *B. cereus* (a un nivel tan alto como 10^8 UFC/g) aun cuando la FDA tenía como límite de contaminación máximo 10^4 UFC/g de *B. cereus* (Shin y col., 2011). En un estudio realizado en China en el 2016 se aisló la cepa 3012 de *B. cereus* a partir de una cerveza de barril esterilizada por filtración, esta cepa es resistente al lúpulo y es capaz de producir ácidos y bioaminas que alteran el sabor de la cerveza (Wang y col., 2016). También se reportó en el 2004 la cepa *Lactobacillus pentosus* ST151BR proveniente de una cerveza en Sudáfrica producida a partir de la fermentación de maíz, cebada, harina de soya y azúcar (Todorov y Dicks, 2004). Con respecto a *Lc. citreum*, esta bacteria no ha sido aislada de cerveza, sin embargo, en Corea se aisló de malta Pilsner durante la maceración en la elaboración de cerveza y se examinó su impacto en la fermentación; reduciendo el pH del mosto con respecto al del control (Choi y col., 2020). En la Gráfica sensorial de percentiles en la Figura 9 se muestra en el eje “Y”

la diferencia que hay en el aroma con respecto al control (cerveza sin inocular) y la cerveza inoculada con cepas, en una escala que va del 0 (no hay diferencia con el control) al 10 (el aroma es completamente distinto al del control) siendo que la media del puntaje para *Lc. citreum* y *B. cereus* es de 5, a la vez que las barras de dispersión al no incluir el cero se demuestra que si hay una diferencia en el aroma de acuerdo a la prueba control-diferencia (Meilgaard y col., 1999) cuando se encuentran presentes las cepas, siendo este un factor importante de deterioro.

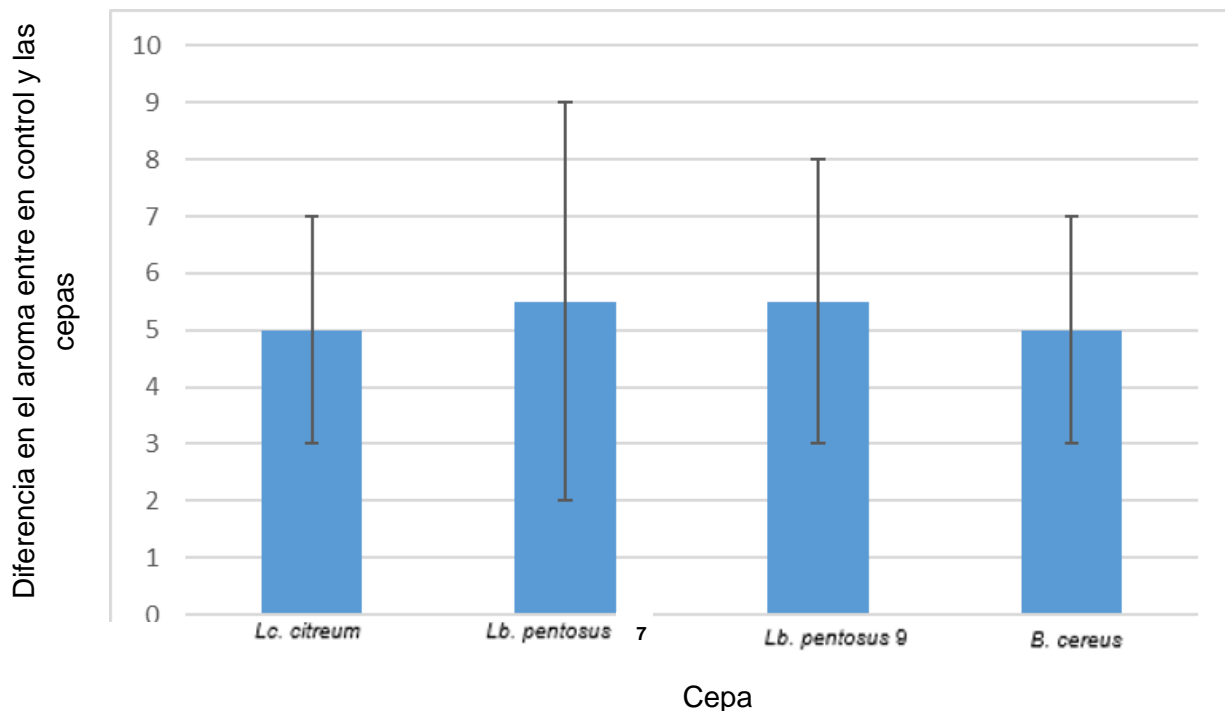


Figura 9. Prueba sensorial control-diferencia en cerveza pilsner inoculada con BAL y *B. cereus* y almacenada a 25°C por 21 días. Cada punto representa la media de tres datos obtenidos de tres réplicas.

Lb. pentosus 7 (BAL-7) y *Lb. pentosus 9* (BAL-9) tuvieron una media un poco más alta que las demás cepas, esto muestra que hubo un mayor cambio en el aroma que fue detectado por los panelistas.

La mayoría de las bacterias Gram positivas involucradas en el deterioro de cerveza pertenecen al grupo de las BAL y representan el 70 % de los incidentes de deterioro microbiano en la industria cervecera, siendo los contaminantes mayoritarios; estas

BAL suelen mostrar tolerancia al etanol y a compuestos derivados del lúpulo (Deasy y col., 2011). *Lb. pentosus* se reconoce con un alto potencial de deterioro de cerveza (Geißler, 2016), es heterofermentativo, resistente al calor y, se ha encontrado en cervecería y bodegas vinícolas, con una gran variabilidad de la tolerancia a los ambientes cerveceros dependiente de la cepa y el aislamiento (Parente y col., 2010).

Lb. pentosus es productor de aminas biogénicas como la putrescina en productos fermentados (Lee y col., 2021) pero hasta ahora no se había reportado en cerveza. *Lc. citreum* también se reconoce como deteriorador de cerveza, ya que es resistente a los compuestos derivados del lúpulo y tolerante al etanol (Hong y col., 2020), se ha aislado de la malta pilsner y produce viscosidad de la cerveza y alteraciones en sus características sensoriales (Choi y col., 2020).

En el 2015 se aisló una cepa de *B. cereus* de una cerveza turbia que había sido retirada del mercado de China y más recientemente, en el mismo país en 2017 se aisló la cepa 3012 de *B. cereus* con características de deterioro de cerveza (Wang y col., 2017) lo que confirma la capacidad de esta bacteria para crecer en la cerveza y cambiar sus características; además, este es un patógeno transmitido por los alimentos que puede causar enfermedades cuando se ingiere una alta concentración de células vegetativas y a causa de la producción de toxinas en los alimentos (Shin y col., 2011), lo cual es una razón más para eliminarlo de la cerveza

IV.3 Aislamiento y cuantificación de bacteriófagos

Específicamente, para el aislamiento de bacteriófagos se procesaron 9 muestras provenientes de bodega vinícola y 8 de cervecería artesanal, de las cuales mediante la prueba de puntos se encontraron 10 bacteriófagos (Cuadro 6). Posteriormente se probaron los bacteriófagos con las cepas individuales mediante la técnica de agar doble capa para cuantificar y seleccionar los más eficientes.

Cuadro 6. Características de los bacteriófagos aislados en ambientes de producción de bebidas alcohólicas.

| Bacteriófago | Concentración inicial (UFP/mL) | Lugar de aislamiento | Superficie | Cepa huésped | |
|--------------|--------------------------------|----------------------|----------------------|--|-----------------------------|
| MI | 1X10 ³ | Bodega vinícola | Caja | <i>Lb. pentosus</i> 10 | |
| MAI | 1X10 ⁵ | | Despalilladora | <i>B. cereus</i> | |
| ME1 | 1X10 ⁵ | | Barrica | <i>Lc. mesenteroides</i> & <i>Lb. pentosus</i> (BAL-7) | |
| ME2 | 7X10 ⁶ | | Tanque | <i>Lc. citreum</i> | |
| ME3 | 2X10 ³ | | Agua Despalilladora | BAL-4 | |
| MP1 | 4X10 ⁶ | | Coladera | BAL-3 | |
| MM | 3X10 ³ | | Filtro | BAL-2 | |
| MP2 | 2X10 ⁵ | | Vinagre | BAL-1 | |
| MCH | 1X10 ⁴ | | Cervecería artesanal | Piso | BAL-9 |
| MLG | 1X10 ⁵ | | | Coladera | <i>Lb. pentosus</i> (BAL-9) |

Se recolectaron más bacteriófagos en la bodega vinícola (80%) que, en la cervecería artesanal, aunque se tomó un número muy similar de muestras. Los bacteriófagos utilizados para el control de bacterias en alimentos se han aislado en materia prima, producto final, ambientes de producción y mayormente en efluentes de agua (Samson y col., 2013; Pao y col., 2004). Los bacteriófagos aislados no mostraron tener efecto en ninguna BAAC, sin embargo, los que se aislaron y tuvieron capacidad antimicrobiana contra *Lb. pentosus* (BAL-7), *Lb. pentosus* (BAL 9) y *B. cereus* se obtuvieron de la superficie de llenado de cerveza y equipos de producción de vino. Los bacteriófagos son los microorganismos más abundantes en la tierra y son

ubicuos en el medio ambiente (Kasman & Porter, 2021), por lo que es fácil encontrarlos en los procesos de producción, como los que se encuentran en el procesamiento de lácteos para BAL (Suárez y col., 2002) o los aislados de alimentos coreanos fermentados específicos para *B. cereus* (Shin y col., 2011).

Los bacteriófagos aislados tenían una concentración baja inicial, esto podría deberse a la fuente de aislamiento, ya que al principio pudo haberse tratado de una mezcla de bacteriófagos, por lo que el título de los fagos individuales en un cóctel de fagos disminuiría cada vez más a medida que más fagos están presentes (Khan y Nilsson, 2015). Al realizar la amplificación en tres pasos y la precipitación con PEG (Li y col., 2020) se alcanzó un título de 10^7 UFP/mL (Figura 9). Mostrando además UFP de un diámetro mayor al que se observaba sin la amplificación.



Figura 9. Obtención de bacteriófagos después de la amplificación y precipitación con PEG.

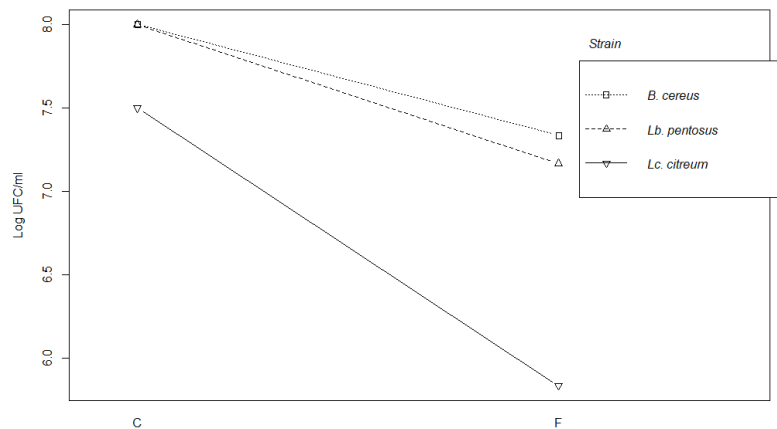
El título de fago también es importante para alcanzar una infección productiva durante su uso (Khan & Nilsson, 2015).

IV.4 Efecto antimicrobiano de los bacteriófagos aislados sobre bacterias ácido lácticas y ácido acéticas en suspensión y adheridas.

Los bacteriófagos más eficientes se probaron con las tres cepas deterioradoras en células suspendidas (Figura 11) y se logró una reducción de 2 ± 0.4 log UFC/mL para *Lc. citreum* (BAL-5) y 1 ± 0.5 log UFC/mL para *B. cereus* y *Lb. Pentosus* 9 (BAL-9). La reducción en células adheridas fue igual para *Lb. pentosus* (BAL 9), para *Lc. citreum* (BAL 5) si hubo una menor reducción en células adheridas de solamente 1

log UFC/mL y para *B. cereus* no hubo reducción en las células adheridas. Los estudios de la acción de los bacteriófagos en células suspendidas mostraron una reducción de 2 log para las células de *Lb. pentosus* y 1 log para las células tanto suspendidas como adheridas para *Lc. citreum* (BAL 5) y *Lb.pentosus* 9 (BAL 9), sin embargo, no hubo reducción en *B. cereus* (Fig. 11).

A. Células suspendidas



B. Células adheridas

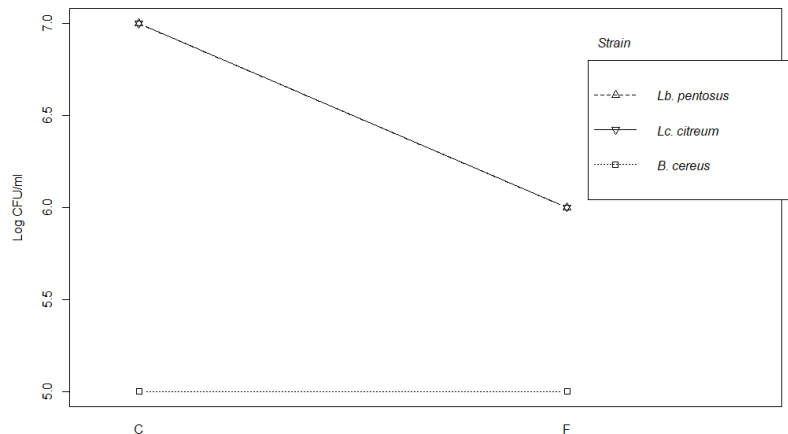


Figura 11. Efecto de bacteriófagos MAI, ME1 y MLG en células suspendidas (**A**) y células adheridas de BAL y *B. cereus* (**B**). Cada punto representa la media de tres datos obtenidos de tres réplicas.

El efecto de la reducción por bacteriófagos en células suspendidas y adheridas indica que los bacteriófagos aislados son capaces de infectar en ausencia de calcio. Estos resultados son similares a la reducción de células de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* con el bacteriófago $\phi 6$ con el cual se obtuvo una reducción máxima de 2.6 log UFC/mL (Pinheiro y col., 2019) y para *S. Typhimurium* una reducción máxima de 2.2 log UFC/mL con el fago ELY-1 (Costa y col., 2019). El nivel de ráfaga se denomina como el número de progenie de fagos liberados de cada huésped infectado, también referido a la fecundidad de los bacteriófagos (Shao y Wang, 2008) y al ser alto aumenta la probabilidad de que los bacteriófagos lleguen a la bacteria objetivo, lo cual es crucial para lograr una infección productiva (Hyman y Abedon, 2010). Si los bacteriófagos pueden eliminar las bacterias infectantes más rápido de lo que pueden replicarse, un nivel de ráfaga alto también resulta en un menor riesgo de selección de las bacterias que sean resistentes a los bacteriófagos (Khan y Nilsson, 2015). Por ello es importante conocer el nivel de ráfaga y el rango de huéspedes de los bacteriófagos.

IV.5 Efecto antimicrobiano de bacteriófagos seleccionados en cerveza pilsner.

Los bacteriófagos MAI, ME2 y MLG se mantuvieron estables en la cerveza durante dos semanas; ya que se cuantificaron durante las cuatro semanas del estudio y en las dos primeras su concentración fue de 10^5 UFP/mL, concentración que disminuyó a partir de la semana 3 a $<10^5$ UFP/mL. Se sabe que los bacteriófagos son estables a valores de pH típicos de la cerveza que oscilan entre 3.8 y 4.7 (Olivier y col., 2009).

En las cervezas inoculadas se observó una reducción en la población bacteriana de: 0.8 log UFC/mL para *Lb. pentosus* 9 (BAL-9), 1 log UFC/mL para *Lc. Citreum* (BAL-5) y 1.2 log UFC/mL para *B. cereus* después de 21 días (Figura 12). Las cepas de *Lb. pentosus* (BAL-9), *Lc. citreum* (BAL-5) y *B. cereus* pudieron sobrevivir en la cerveza durante 21 días, aun cuando las características de la cerveza son hostiles, teniendo un pH bajo, alta acidez y contenido de etanol, lúpulo, CO₂, falta de nutrientes y ausencia de oxígeno; estos factores impiden el crecimiento de la mayoría de los

microorganismos (Liu y col., 2018), pero para las BAL del género *Lactobacillus*, estas condiciones son favorables, ya que son uno de los deterioros más comunes de la cerveza, y algunas de estas cepas son tolerantes al lúpulo y por lo tanto desarrollan bien en estas condiciones (Schneiderbanger y col., 2020).

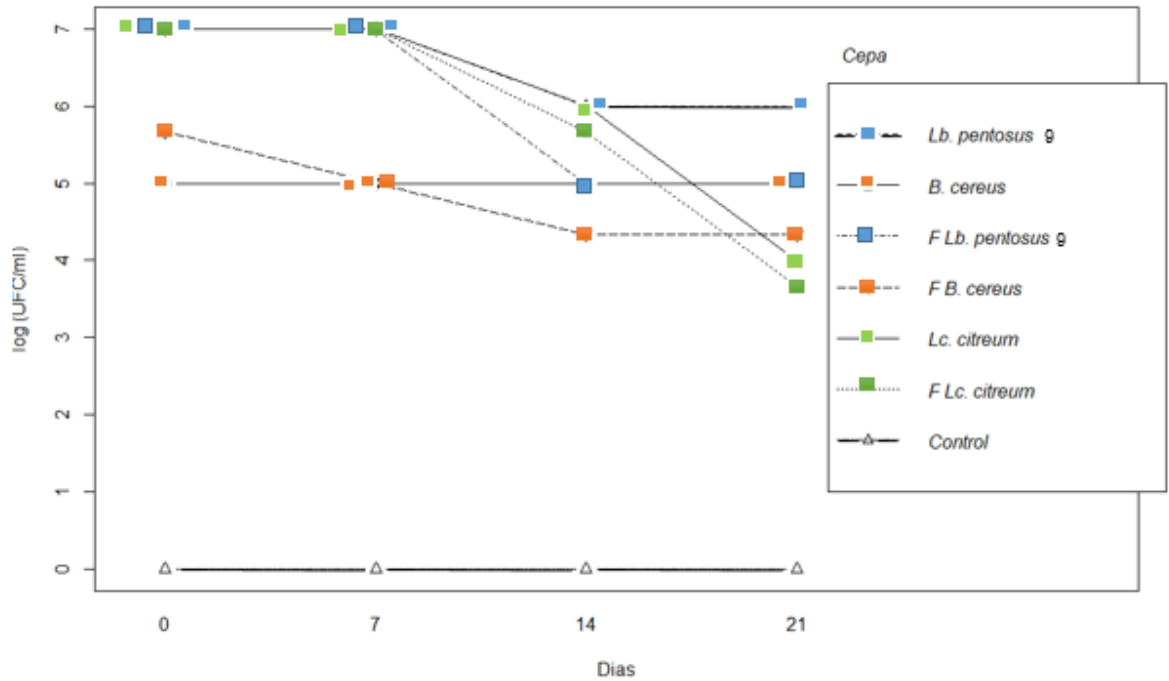


Figura 12. Población de bacterias deterioradoras debido a la aplicación de bacteriófagos en cerveza pilsner durante su almacenamiento a 25 °C. Las líneas discontinuas indican la presencia del bacteriófago y las líneas continuas solamente la cepa. Cada punto representa la media de tres datos obtenidos de tres réplicas.

El efecto de los bacteriófagos en la cerveza fue similar al de las células suspendidas, y los niveles de cationes divalentes en la cerveza pueden ser suficientes para sustentar la infección. En el agua de elaboración, el calcio es uno de los minerales predominantes responsables de la precipitación de fosfatos con la liberación concomitante de iones de hidrógeno, lo que reduce el pH del macerado (Goldammer, 2008). Esto concuerda con los hallazgos del bacteriófago JL-1, que infecta a su huésped *Lb. plantarum* en presencia o ausencia de calcio, aunque en presencia de calcio, se demostró que el ciclo de vida del fago es más corto (Deasy y col., 2011).

De manera general hubo un incremento en la DO, para el control y las cepas, con excepción de *B. cereus* (Figura 13). Para *Lc. citreum* y *Lb. pentosus* (BAL-9) se observó un mayor incremento en la DO. 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.

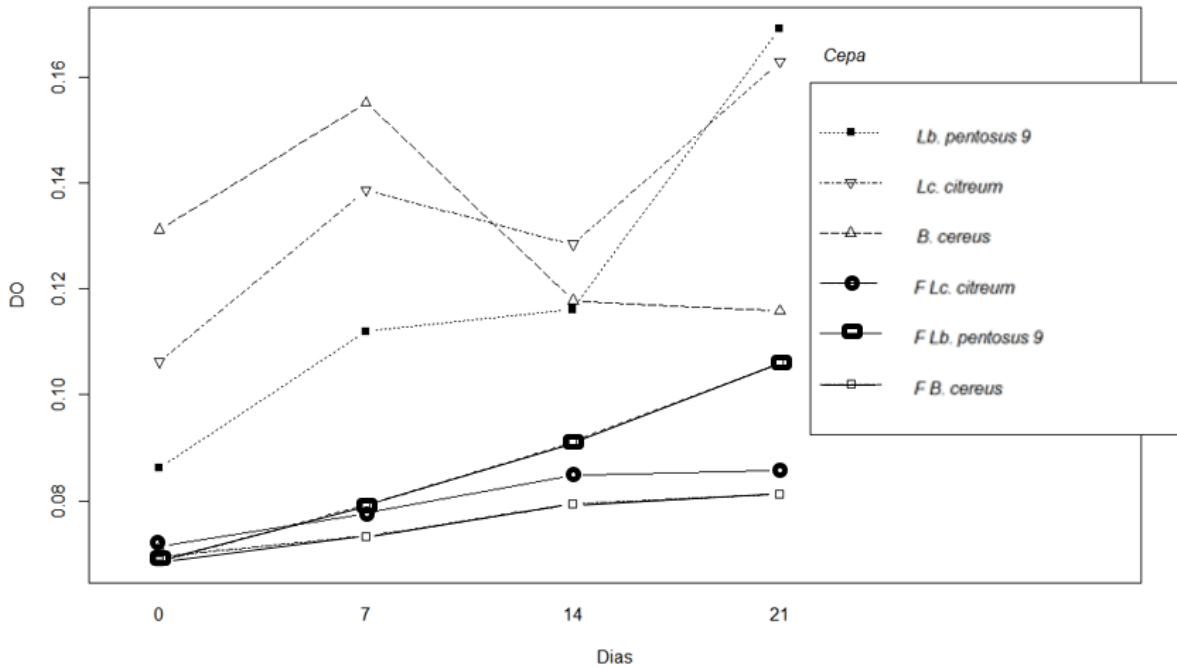


Figura 13. Densidad óptica en cerveza pilsner inoculada con bacterias deterioradoras y bacteriófagos. Las líneas discontinuas indican la presencia de bacterias + bacteriófago y las líneas continuas solamente la bacteria. Cada punto representa la media de tres datos obtenidos de tres réplicas.

La mayoría de las cervezas tienen un rango de pH relativamente bajo (3.4 – 4.8), este pH daña el sistema enzimático celular de las bacterias y también mejora el efecto inhibitorio del lúpulo (Yu y col., 2019). El cambio de pH en la cerveza inoculada con *B. cereus* y *Lb. pentosus* (BAL-9) es muy similar, mientras que la reducción en pH para *Lc. citreum* fue menor (Figura 14). En las tres cepas se observó una disminución en el pH al día 7, seguido de un aumento al día 14 y una posterior

disminución en el día 12 mientras que en el control el pH fue aumentando ligeramente con el paso de los días, cuando no se adicionaron los bacteriófagos se observó que el pH fue 0.5 unidades más bajo, esto pudo ser debido a que, si bien se utilizó la misma cerveza, el proceso de desgasificación al ser manual tiene variaciones en la remoción del dióxido de carbono.

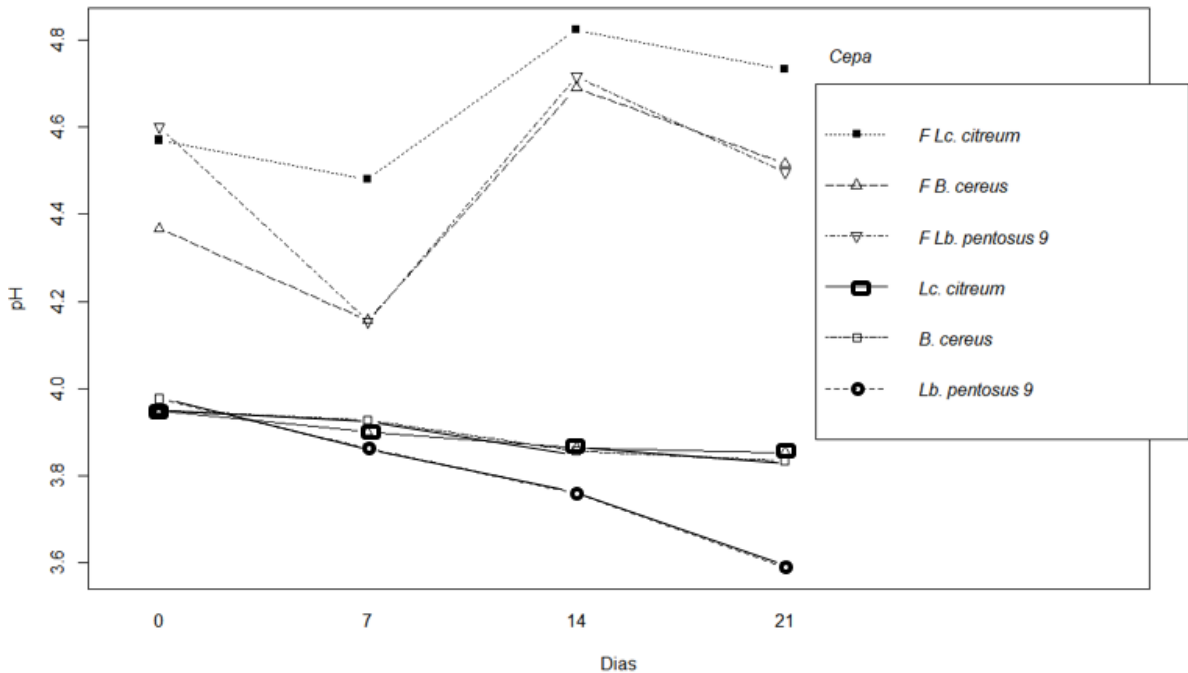


Figura 14. Efecto en el pH en cerveza pilsner inoculada con bacterias deterioradoras y bacteriófagos. Las líneas discontinuas indican la presencia de bacterias + bacteriófago y las líneas continuas solamente la bacteria. Cada punto representa la media de tres datos obtenidos de tres réplicas.

El incremento de ácidos orgánicos puede resultar en un bajo pH y un mal sabor en la cerveza, impactando severamente los perfiles de sabor (Yu y col., 2019).

La acidez se mantiene estable durante el mes de estudio, mostrando ligeras variaciones, pero no siendo estadísticamente diferentes (Figura 15). Con la prueba de Dunnet se establece que la acidez de las cepas con y sin bacteriófago es igual.

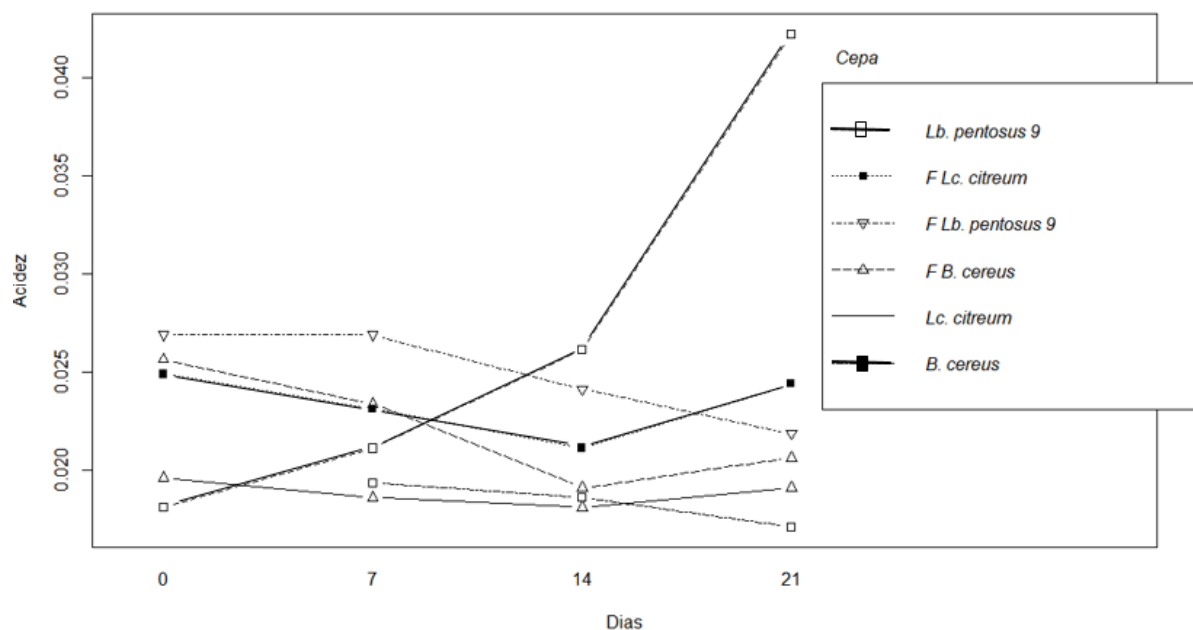


Figura 15. Efecto en la acidez en cerveza pilsner inoculada con bacterias deterioradoras y bacteriófagos. Las líneas discontinuas indican la presencia de bacterias + bacteriófago y las líneas continuas solamente la bacteria. Cada punto representa la media de tres datos obtenidos de tres réplicas.

Lb. pentosus (BAL-9) sin bacteriófago aumentó la acidez con el paso del tiempo, siendo el mayor aumento al día 21 aunque la diferencia no fue significativa estadísticamente. 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). Para evitar 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, aunque muchas veces esto no es suficiente para eliminar estos microorganismos. Los bacteriófagos 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 y col., 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).

Hubo una disminución en la mediana del aroma para *Lb. pentosus* 9 (BAL-9) y *B. cereus* que pasaron de 5.5 y 5 en la prueba sensorial sin bacteriófagos a 4 en la prueba sensorial con bacteriófagos (Figura 16) por lo que existe una diferencia entre la cerveza deteriorada y la cerveza deteriorada con bacteriófagos, teniendo esta última una menor diferencia en el aroma con respecto al control (cerveza no deteriorada). La cepa de *Lc. Citreum* (BAL-5) se mantuvo igual, por lo que no hay diferencia en el aroma con la adición de bacteriófagos.

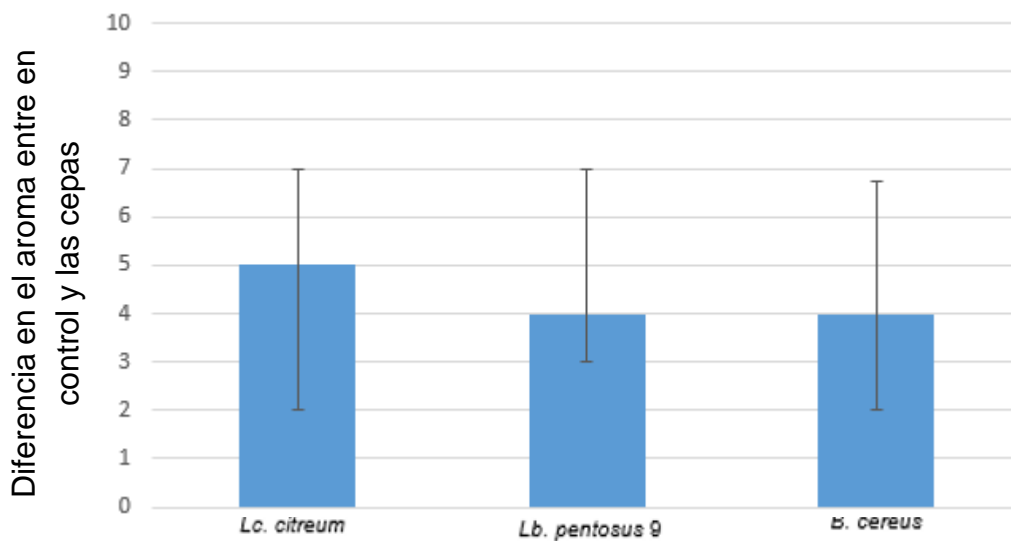


Figura 16. Prueba sensorial control-diferencia en cerveza pilsner inoculada con bacterias deterioradoras y bacteriófagos.

La consecuencia del crecimiento bacteriano en la cerveza pueden ser cambios en el aroma, apariencia, sabor y textura (Suzuki, 2011); ciertamente estas alteraciones pueden conducir al rechazo del producto y posteriormente a pérdidas económicas.

Los bacteriófagos pueden utilizarse como una estrategia de control para la actividad de estas bacterias. Los resultados de la PCR para los bacteriófagos no son mostrados debido a que no hubo amplificación con los iniciadores descritos en la metodología (Cuadro 3), esto podría deberse a la concentración de los bacteriófagos por lo que se requiere concentrar o enriquecer la suspensión de cada bacteriófago para lograr una amplificación correcta y su identificación. Debido a la alta tasa de mutación que tienen los bacteriófagos, es posible que los iniciadores reportados ya no funcionen para la PCR (Clokic, 2009).

Los bacteriófagos se han probado en alimentos cárnicos y lácteos, sin embargo, su aplicación podría ampliarse a otras matrices alimentarias como es el caso de la cerveza artesanal, al demostrar que son estables en este tipo de matrices alimentarias durante dos semanas. El estudio de bacteriófagos como bio conservadores 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., 2020); lo que hace una buena opción el uso de bacteriófagos como una estrategia de reducción e incluso eliminación de microorganismos.

La eficacia de los bacteriófagos varió según la cepa en la cual se aplicaron. Se sabe que se requiere calcio u otros cationes divalentes para una infección exitosa por bacteriófagos, lo que se corrobora con la evaluación de la infección de estos virus, ya que el agar se suplementó con CaCl_2 y las unidades formadoras de placa aumentaron en 57 ± 16 UFP/mL.

Estudios recientes han explorado el uso de fagos para controlar los patógenos transmitidos por los alimentos y los microorganismos de descomposición. Por ejemplo, los ensayos alimentarios que utilizan bacteriófagos dirigidos a *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* en una variedad de matrices alimentarias, así como en superficies inertes, han reducido con éxito la carga de contaminantes (Deasy y col., 2011). Los bacteriófagos se han utilizado para muchas aplicaciones de control biológico en los alimentos y han contribuido con éxito al control de

Campylobacter spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y varios organismos que deterioran los alimentos (Hudson y col., 2005; Lang, 2006). De hecho, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria publicó una revisión extensa del uso exitoso de bacteriófagos en productos lácteos, pollo, carne de res, cerdo, mariscos y entornos de procesamiento de alimentos y en superficies metálicas (Olivier y col., 2009).

V. CONCLUSIONES

El presente trabajo representa el primer estudio de bacteriófagos específicos para *Lb. pentosus*, *Lc. citreum* y *B. cereus*, aplicados en cerveza, demostrando su potencial como una estrategia alternativa y natural para el control de la contaminación bacteriana en la industria de la cervecería artesanal. Este es el primer trabajo que evalúa el uso de un bacteriófago aplicado en cerveza específico para *B. cereus*, este bacteriófago podría proporcionar una herramienta adicional para abordar los problemas asociados con la contaminación por *B. cereus* en cerveza artesanal, al ser un patógeno emergente como deteriorador en cerveza.

La reducción lograda de los bacteriófagos sobre las cepas deterioradoras de cerveza permitiría conservar la frescura de la bebida a lo largo del almacenamiento. El uso de estos bacteriófagos puede ser un componente del sistema de control de las bacterias deterioradoras, pero no sustituye la aplicación de prácticas higiénicas en la producción de las bebidas y el mantenimiento de una cadena de frío oportuna y eficiente. El bio-control con bacteriófagos puede ser una herramienta adicional para tratar problemas asociados con bacterias deterioradoras en cerveza artesanal, sin embargo, se requiere optimizar la eficiencia de 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 de la cervecería artesanal.

VI. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento Informado para Participantes de la Evaluación de Aroma de cerveza

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos
C.U., Cerro de las Campanas s/n, Colonia Las Campanas,
C.P. 76010, Querétaro, Qro.

Título del proyecto: “Aislamiento y caracterización de bacteriófagos con actividad inhibitoria de bacterias ácido lácticas y ácido acéticas”

Investigador responsable: Dra. Sofía María Arvizu Medrano.

Nombre del evaluador: Alexia Joana López Gachuzo.

En el Laboratorio de Inocuidad microbiana ubicado en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, dirección; Centro Universitario, Cerro de las Campanas s/n C.P. 76010. Santiago de Querétaro, Qro. México, se preparará la evaluación de una prueba de aroma de una cerveza pilsner comercial, inoculada con cepas de bacterias deterioradoras de la bebida y bacteriófagos que las inhiben; ninguno de estos microorganismos se considera patógeno al humano.

La presente investigación es dirigida por: Dra. Sofía María Arvizu Medrano (sofia.arvizu@uaq.mx/442-192-1200 ext.5556) y la alumna Alexia Joana López Gachuzo (alopez43@alumnos.uaq.mx/ Tel.427-224-2715)

Justificación del estudio

Las bebidas alcohólicas como la cerveza tienen condiciones adversas para el desarrollo de microorganismos, sin embargo, algunos de ellos como las bacterias ácido lácticas y las bacterias ácido acéticas son capaces de desarrollar en este

ambiente y producir características de deterioro en estos productos. Por ello se propone el uso de bacteriófagos como bioconservadores en cerveza.

Objetivo del estudio

Evaluar la diferencia del aroma entre una muestra de cerveza comercial no inoculada con bacterias deterioradoras y muestras inoculadas con bacterias y bacteriófagos.

Duración del estudio

El estudio tendrá una duración aproximada de 15 minutos.

Riesgos asociados con el estudio

No hay riesgo a la salud para los participantes, ya que ninguno de los productos será consumido, sólo se percibirá el aroma.

Por ende, es importante mencionar, que si durante la evaluación se detecta algún síntoma que pudiera requerir tratamiento médico, se informará al área de Coordinación de Seguridad e Higiene de La Facultad de Química con el Dr. Julio Armando de Lira Flores (julio.lira@uaq.mx).

Declaración de consentimiento

La participación en esta evaluación sensorial es estrictamente voluntaria y no se usará para ningún otro propósito fuera de esta investigación. Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él. La información que se recoja será única y exclusiva para el análisis sensorial del aroma en cerveza comercial, dicho producto es seguro de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-199-SCFI-2017, Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba, además el producto no será consumido por ninguno de los panelistas.

Acepto participar voluntariamente en este proyecto de investigación, conducido por; Dra. Sofía María Arvizu Medrano (sofia.arvizu@uaq.mx/442-192-1200 ext.5556) y la alumna Alexia Joana López Gachuzo (alopez43@alumnos.uaq.mx/ Tel.427-224-2715). He sido informado (a) del objetivo de esta investigación que es evaluar la diferencia del aroma entre muestras de cerveza comercial inoculada con bacterias deterioradoras y bacteriófagos con respecto a un control.

Reconozco que la información que yo provea en el transcurso de este proyecto de investigación es con mi consentimiento, con fines de información estadística para calificar la diferencia entre cerveza comercial inoculada con bacterias deterioradoras y bacteriófagos, garantizando la confidencialidad de los datos proporcionados por el participante. He sido informado de que puedo hacer preguntas de duda o aclaración sobre el proyecto en cualquier momento.

Tomando todo ello en consideración y en tales condiciones, **CONSIENTO** participar en el análisis sensorial y que los datos que se deriven de mi participación sean utilizados para cubrir los objetivos especificados en el documento.

VII. REFERENCIAS

Ackermann, H. W. (2011). Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*. 32:90-94.

Ackermann, H. W. (2012). Bacteriophage electron microscopy. *Advances in Virus Research*, 82, 1-32.

Adachi, O., Ano, Y., Toyama, H., & Matsushita, K. (2007). Biooxidation with PQQ-and FAD-dependent dehydrogenases. *Modern Oxidation*. 15:1-41

Arshad, M. S., & Batool, S. A. (2017). Natural antimicrobials, their sources and food safety. *Food Additives*. 1:88-89.

Audenaert, K., D'Haene, K., Messens, K., Ruysen, T., Vandamme, P., & Huys, G. (2010). Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*. 27:12-18.

Bartowsky E. J. (2009). Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*. 48:149-156.

Beneduce, L., Spano, G., Vernile, A., Tarantino, D., & Massa, S. (2004). Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. *Journal of Basic Microbiology*. 44:10-16.

Bouchez, A & De Vuyst, L. (2022). Acetic Acid Bacteria in Sour Beer Production: Friend or Foe?. *Frontiers in Microbiology*, 2490.

Breitbart, M. (2012). Marine viruses: truth or dare. *Annual Review of Marine Science*. 4:425-448.

Centro de Tecnología de Fagos. (2018). Protocolo para la Extracción de ADN de Fagos con Fenol: Cloroformo. 9 de agosto de 2022, Universidad de Texas A&M. Sitio web: <https://cpt.tamu.edu/wordpress/wp-content/uploads/2018/09/Phage-DNA-Extraction-by-PhenolChloroform-Protocol.pdf>

Centro de Tecnología de Fagos. (2020). Protocolo para tinción de rejilla TEM. 12 de agosto de 2022, Universidad de Texas A&M. Sitio web: https://cpt.tamu.edu/wordpress/wpcontent/uploads/2020/05/TEM_grid_protocol_200501.pdf

Choi, E. J., Park, J. W., Kim, J. H., & Kim, W. J. (2020). Biological acidification and beer quality: addition of lactic acid bacteria isolated from malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 126(2), 176-183.

Clokier, M. (2009). PCR and partial sequencing of bacteriophage genomes. In *Bacteriophages* (pp. 47-55). Humana Press.

Cordero-Bueso, G., Moraga, J., Ríos-Carrasco, M., Ruiz-Muñoz, M., & Cantoral, J. M. (2020). Bacteriophages as an up-and-coming alternative to the use of sulfur dioxide in winemaking. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2931.

Costa, P., Pereira, C., Gomes, A. T., & Almeida, A. (2019). Efficiency of single phage suspensions and phage cocktail in the inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: An in vitro preliminary study. *Microorganisms*, 7(4), 94.

Cosme, F., Vilela, A., Filipe-Ribeiro, L., Inês, A., & Nunes, F. M. (2018). Wine microbial spoilage: Advances in defects remediation. In *Microbial Contamination and Food Degradation* (pp. 271-314). Academic Press.

Deasy, T., Mahony, J., Neve, H., Heller, K. J., & Van Sinderen, D. (2011). Isolation of a virulent *Lactobacillus brevis* phage and its application in the control of beer spoilage. *Journal of food protection*, 74(12), 2157-2161.

Dmitri, Popov. (2021). Bacteriophages, classification. Advanced Medical Technologies and Systems Inc. Canada. Literature Overview. Recuperado el 28 de abril de 2021 en: https://www.researchgate.net/publication/348393840_Bacteriophages_Classification

Dong, Y., Zheng, K., Zou, X., Liang, Y., Liu, Y., Li, X., ... & Wang, M. (2022). Characterization and genomic analysis of the first podophage infecting *Shewanella*, representing a novel viral cluster. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1-13.

Dysvik, A., La Rosa, S. L., De Rouck, G., Rukke, E. O., Westereng, B., & Wicklund, T. (2020). Microbial dynamics in traditional and modern sour beer production. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(14), 56-66

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., ... & Van Sinderen, D. (2019). Isolation and characterization of *Lactobacillus brevis* phages. *Viruses*. 11:393.

Garcia, P., Martinez, B., Obeso, J. M., & Rodriguez, A. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*. 47:479-485.

Geißler, A. (2016). Lifestyle of beer spoiling lactic acid bacteria (Doctoral dissertation, Technische Universität München).

George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier & Foligné, B. (2018). Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: A multifaceted functional health perspective. *Frontiers in Microbiology*. 9:2899-2902.

Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C., Baggiani, A., & Senesi, S. (2002). Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiology Letters*, 208(1), 129-134.

Gibson, S. B., Green, S. I., Liu, C. G., Salazar, K. C., Clark, J. R., Terwilliger, A. L., & Ramig, R. F. (2019). Constructing and characterizing bacteriophage libraries for phage therapy of human infections. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2537.

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

Gilmore, B. F. (2012). Bacteriophages as anti-infective agents: recent developments and regulatory challenges. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 5:533-535.

Goldammer, T. (2008). *The brewer's handbook: the complete guide to brewing beer*, 2nd ed. Apex Publishers, Clifton, VA.

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.

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 78:79-97.

Guyot-Declerck, C., François, N., Ritter, C., Govaerts, B., & Collin, S. (2005). Influence of pH and ageing on beer organoleptic properties. A sensory analysis based on AEDA data. *Food quality and preference*, 16(2), 157-162.

Hamasaki, Y., Ayaki, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., & Morita, H. (2003). Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:3668-3675.

Han, P., Zhang, W., Pu, M., Li, Y., Song, L., An, X., & Tong, Y. (2022). Characterization of the Bacteriophage BUCT603 and Therapeutic Potential Evaluation Against Drug-Resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in a Mouse Model. *Frontiers in Microbiology*, 13.

Hernández Magadán, A. (2007). Aislamiento, caracterización y detección precoz de bacteriófagos de *Streptococcus thermophilus* en la industria láctea. Universidad de Oviedo, España.

Hommel, R.K. (2014). Methods of Detection. In: *Encyclopedia of Food Microbiology* 2nd Edition. Elsevier. 3-10.

Hong, L. S., Kim, J. H., & Kim, W. J. (2020). Rapid detection of beer-spoilage lactic acid bacteria: Modified hop-gradient agar with ethanol method. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 296-303.

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.

Hudson, J. A., Billington, C., Carey-Smith, G., & Greening, G. (2005). Bacteriophages as biocontrol agents in food. *Journal of Food Protection*, 68(2), 426-437.

Hyman, P. (2019). Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. *Pharmaceuticals*, 12:35-37.

Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 70, 217-248.

Jeon, S. H., Kim N. H., Shim M.B., Jeon Y. W., Ahn J.H., Lee S.H., Hwang I.G., & Rhee M.S. (2015). Microbiological diversity and prevalence of spoilage and pathogenic bacteria in commercial fermented alcoholic beverages (beer, fruit wine, refined rice wine, and yakju). *Journal of Food Protection*, 78:812–818.

Jurač, K., Nabergoj, D., & Podgornik, A. (2019). Bacteriophage production processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2), 685-694

Kalschne, D. L., Womer, R., Mattana, A., Sarmento, C. M. P., Colla, L. M., & Colla, E. (2015). Characterization of the spoilage lactic acid bacteria in “sliced vacuum-packed cooked ham”. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46:173-181.

Kasman, L. M., & Porter, L. D. (2020). Bacteriophages. Recuperado el 15 de marzo de 2021 en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/>

Kasman, L. M., & Porter, L. D. (2021). Bacteriophages. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.

Kazi, M., & Annapure, U. S. (2016). Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *Journal of Food Science and Technology*. 53:1355-1362.

Khan. K., & Nilsson, A. S. (2015). Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLoS one*. 10:3-7.

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.

Kreyenschmidt, J., Hübner, A., Beierle, E., Chonsch, L., Scherer, A., & Petersen, B. (2010). Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. *Journal of Applied Microbiology*. 108: 510-520.

Kröckel, L. (2013). The role of lactic acid bacteria in safety and flavor development of meat and meat products. Recuperado el 21 de marzo en: <https://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/the-role-of-lactic-acid-bacteria-in-safety-and-flavour-development-of-meat-and-meat-products>.

Lang, L. H. (2006). FDA approves use of bacteriophages to be added to meat and poultry products. *Gastroenterology*, 131(5), 1370.

Latorre, M., Bruzone, M. C., de Garcia, V., & Libkind, D. (2022). Contaminantes microbianos en cervezas artesanales embotelladas de la Patagonia andina argentina. *Revista Argentina de Microbiología*.

Lee, J., Jin, Y. H., Pawluk, A. M., & Mah, J. H. (2021). Reduction in Biogenic Amine Content in Baechu (Napa Cabbage) Kimchi by Biogenic Amine-Degrading Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, 9(12), 2570.

Li, C., Yuan, X., Li, N., Wang, J., Yu, S., Zeng, H., ... & Ding, Y. (2020). Isolation and characterization of *Bacillus cereus* phage vB_BceP-DLc1 reveals the largest member of the Φ 29-like phages. *Microorganisms*, 8(11), 1750.

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.

Linares, J. R., Gutiérrez, N., Rivera, B. E., Pérez, S. B., & Nevárez, G. V. (2018). Biocontrol processes in fruits and fresh produce, the use of lactic acid bacteria as a sustainable option. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2:50-54.

Liu, J., Deng, Y., Li, L., Li, B., Li, Y., Zhou, S., ... & Peters, B. M. (2018). Discovery and control of culturable and viable but non-culturable cells of a distinctive *Lactobacillus harbinensis* strain from spoiled beer. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.

Longin, C., Guilloux-Benatier, M., & Alexandre, H. (2016). Design and performance testing of a DNA extraction assay for sensitive and reliable quantification of acetic acid bacteria directly in red wine using real time PCR. *Frontiers in Microbiology*, 7, 831.

Maciel, N. E. (2012). Lisogenia y mecanismos nativos de fagorresistencia presentes en bacterias lácticas salvajes y comerciales (Disertación doctoral). Universidad nacional del Litoral, Argentina.

MamLouk, D., & Gullo, M. (2013). Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4), 377-384.

Marcó, M. B., Moineau, S., & Quiberoni, A. (2012). Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*. 2:149-158.

Marmolejo, X. Y. O. (2021). Producción de aminas biogénicas y susceptibilidad a germicidas de bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos fermentados. Universidad Autónoma de Querétaro.

Massaguer, P. (2006). *Microbiología dos Processos Alimentares*. Varela; São Paulo. 118-121.

Meilgaard, M. C., Carr, B. T., & Civille, G. V. (1999). *Sensory evaluation techniques*. CRC press.

Menz, G., Andrighetto, C., Lombardi, A., Corich, V., Aldred, P., & Vriesekoop, F. (2010). Isolation, identification, and characterisation of beer-spoilage lactic acid bacteria from microbrewed beer from Victoria, Australia. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(1), 14-22.

Mohamed, S. H., Gado, E. A., Gomaa, H., & Sadik, A. S. (2016). Characterization of bacterial soft rot strains and their specific phages isolated from soil at taif. *Pakistan Journal of Biotechnology*. 13:111-116.

Mollinger, J. (2019). The use of bacteriophages to prevent bacterial spoilage of beer (Doctoral dissertation).

Nasery, M., Hassanzadeh, M. K., Najaran, Z. T., & Emami, S. A. (2016). Essential oils in food preservation, flavor and safety. Academic Press. 659-665.

Ni, K., Wang, Y., Li, D., Cai, Y., & Pang, H. (2015). Characterization, Identification and Application of Lactic Acid Bacteria Isolated from Forage Paddy Rice Silage. *Plos One*. 10:3-12.

Nikita, C., & Hemangi, D. (2012). Isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria from dairy sludge sample. *Journal of Environmental Research and Development*. 7:1-11.

Nychas, G. J., Lianou, A., & Panagou, E. Z. (2011). Microbiological spoilage of foods and beverages. In: *The Stability and Shelf Life of Food*. Woodhead Publishing. 3-42.

Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., & Stratev, D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 19:311-331.

Osborne, J.P. (2010). Advances in microbiological quality. In: *Managing Wine Quality*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition 162-188.

Pao, S., Rolph, S. P., Westbrook, E. W., & Shen, H. (2004). Use of bacteriophages to control Salmonella in experimentally contaminated sprout seeds. *Journal of Food Science*, 69(5), M127-M130.

Paradh, A. Hill, A. (2016). Review: Gram Negative Bacteria in Brewing. *Advances in Microbiology*. 6:195-209.

Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis, G. E., & Torriani, S. (2010). Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), 270-279.

Petri, A., Pfannebecker, J., Fröhlich, J & König, H. (2013). Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiology*. 33:48-54

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.

Pinheiro, L. A., Pereira, C., Frazão, C., Balcão, V. M., & Almeida, A. (2019). Efficiency of phage $\phi 6$ for biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: an in vitro preliminary study. *Microorganisms*, 7(9), 286.

Polaska M & Sokołowska B. (2019). Bacteriophages: a new hope or a huge problem in the food industry. *AIMS Microbiology*. 5:324-346.

Principi, N., Silvestri, E., & Esposito, S. (2019). Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. *Frontiers in pharmacology*, 10, 513.

Quinto, E. J., Caro, I., Villalobos, L. H., Mateo, J., Silleras, B., & Redondo, M. P. (2019). Food Safety Through Natural Antimicrobials. *Antibiotics*. 8:208-212.

Queretaro Ciudad. (2023). Cerveza Artesanal. 11 de enero de 2023, Secretaría de Turismo. Sitio web: <http://www.queretarociudad.travel/cerveza/>

Ray F. (2005). Microbial food spoilage. *Fundamental food microbiology*. 3^{ra} Ed. CRC Press LLC. 255–319.

Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 5:47-56.

Robinson, R. K. (2014). *Encyclopedia of food microbiology*. Academic press.

Romero, V., García, P., Garrido, A., & Arroyo, F. N. (2016). Susceptibility and resistance of lactic acid bacteria and yeasts against preservatives with potential application in table olives. *Food Microbiology*. 54:72-79.

Ronald S. (2008.) Postfermentation treatments and related topics. *Wine Science* 3rd Ed. Elsevier. 418-519.

Sabouri Ghannad, M., & Mohammadi, A. (2012). Bacteriophage: time to re-evaluate the potential of phage therapy as a promising agent to control multidrug-resistant bacteria. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 15:693-701.

Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., & Moineau, S. (2013). Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 675-687.

Schneiderbanger, J., Jacob, F., & Hutzler, M. (2020). Mini-Review: The current role of lactic acid bacteria in beer spoilage. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 73, 2.

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.

Shin, H., Bandara, N., Shin, E., Ryu, S., & Kim, K. P. (2011). Prevalence of *Bacillus cereus* bacteriophages in fermented foods and characterization of phage JBP901. *Research in Microbiology*, 162(8), 791-797.

Shao, Y., & Wang, I. N. (2008). Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. *Genetics*, 180(1), 471-482.

Sidhu, M. S., Langsrud, S., & Holck, A. (2001). Disinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from the food industry. *Microbial Drug Resistance*. 7:73-83.

Sperber W.H & Doyle M.P. (2009). Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, *Food Microbiology and Food Safety*. Springer. 215-217.

Suzuki, K. (2011). 125th anniversary review: microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(2), 131-155.

Suárez, V. B., Quiberoni, A., Binetti, A. G., & Reinheimer, J. A. (2002). Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries. *Journal of Food Protection*, 65(10), 1597-1604.

Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., & Kitamoto, K. (2008). Sake and beer spoilage lactic acid bacteria—a review. *Journal of the Institute of Brewing*. 114:209-223.

Taroub, B., Salma, L & Manel, Z. (2019). Isolation of lactic acid bacteria from grapefruit: antifungal activities, probiotic properties, and in vitro detoxification of ochratoxin. *Annals of Microbiology*. 69:17-27

Teusink, B., & Molenaar, D. (2017). Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. *Current Opinion in Systems Biology*. 6:7-13.

Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2004). Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(6), 643-650.

Villacreces, S., Blanco, C. A., & Caballero, I. (2022). Developments and characteristics of craft beer production processes. *Food bioscience*, 45, 101495.

Vidic, J., Chaix, C., Manzano, M., & Heyndrickx, M. (2020). Food sensing: detection of *Bacillus cereus* spores in dairy products. *Biosensors*, 10(3), 15.

Viridis, C., Sumbly, K., Bartowsky, E., & Jiranek, V. (2021). Lactic acid bacteria in wine: Technological advances and evaluation of their functional role. *Frontiers in Microbiology*, 11, 612118.

Wang, W., Liu, Y., Sun, Z., Du, G., & Li, X. (2017). Hop resistance and beer-spoilage features of foodborne *Bacillus cereus* newly isolated from filtration-sterilized draft beer. *Annals of Microbiology*, 67(1), 17-23.

Weitz, J. S., & Wilhelm, S. W. (2012). Ocean viruses and their effects on microbial communities and biogeochemical cycles. *F1000 Biology Reports*. 4:17-21.

Wittebole, X., De Roock, S., & Opal, S. M. (2014). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*. 5:226-235.

Yamada, Y. (2016). Systematics of acetic acid bacteria. In *Acetic acid bacteria*. Springer. 41-50.

Young, R. Y., Wang, N., & Roof, W. D. (2000). Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in Microbiology*. 8:120-128.

Yu, Z., Luo, Q., Xiao, L., Sun, Y., Li, R., Sun, Z., & Li, X. (2019). Beer-spoilage characteristics of *Staphylococcus xylosus* newly isolated from craft beer and its potential to influence beer quality. *Food science & nutrition*, 7(12), 3950-3957.

Zhou, Y., Drouin, P., & Lafrenière, C. (2016). Effect of temperature (5-25 °C) on epiphytic lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage. *Journal of Applied Microbiology*. 121:657-671.