



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Caracterización de bacteriófagos con capacidad inhibitoria de bacterias ácido lácticas productoras de aminas biogénicas en cerveza”

Tesis

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

Presenta

IAG. Yuridia Sarahí Bueno González

Dirigido por:

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Querétaro, Qro. a 25 de Enero 2024



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Caracterización de bacteriófagos con capacidad
inhibitoria de bacterias ácido lácticas productoras de
aminas biogénicas en cerveza

por

Yuridia Sarahí Bueno González

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQMAC-309130



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

**Caracterización de bacteriófagos con capacidad
inhibitoria de bacterias ácido lácticas productoras
de aminas biogénicas en cerveza.**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta

IAG. Yuridia Sarahí Bueno González

Dirigido por

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

SINODALES

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Presidenta

Firma

Dr. Mauricio A. Redondo Solano
Secretario

Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Vocal

Firma

Dra. Dalia E. Miranda Castilleja
Suplente

Firma

Dra. María del Carmen González
López
Suplente

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de investigación y posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Enero de 2024

México

Dedicatorias

A mamá y mi abuelito que están en el cielo y que siempre creyeron en mí y me motivaron para lograr todos mis objetivos. Siempre los llevo en el corazón.

A mi papá y hermanos.

A mi hermosa familia: Héctor y Ron.

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante la ejecución de mi trabajo de tesis de manera ética y que incluí los detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en investigaciones futuras.

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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Yuridia Sarahí Bueno González', written in a cursive style.

Yuridia Sarahí Bueno González

Agradecimientos

A la Dra. Sofí por aceptar ser mi asesora, por compartir conmigo sus conocimientos, experiencia y sobre todo tiempo, por ayudarme a ser paciente, por confiarme el proyecto y guiarme, por su apoyo emocional y económico, por ser la mejor asesora y un gran ser humano, mis infinitos agradecimientos.

A la Dra. Dalia por el apoyo técnico e intelectual a mi proyecto, gracias por agendarme y llevarme a los muestreos, por ser una gran persona y reconfortarme en situaciones difíciles, porque desde hace 5 años que la conozco ha sido una gran persona conmigo.

Al Dr. Mauricio, Dra. Monse y Dra Carmen por todo el apoyo intelectual y técnico en el desarrollo del proyecto, por compartir conmigo parte de su tiempo, conocimientos y experiencia. Dra. Monse, gracias por hacernos partícipes del foro de inocuidad.

A la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla, por la tinción y la primera observación del fago 8M2.

Al M. en C. Carlos Daniel Cordero Rivera, del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (CINVESTAV) por el establecimiento de la donación de tubos, establecimiento de la metodología y apoyo técnico en la ultracentrifugación; al Dr. Daniel Talamás Lara del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE-CINVESTAV) por la tinción y visualización mediante TEM de los bacteriófagos M2M, 44M2 y 44M3.

A mi hermano Elmer que siempre estuvo dándome ánimo durante todo el proceso de la maestría y por impulsarme a continuar estudiando, por siempre creer en mí y estar a mi lado en los tiempos difíciles. Por ser el mejor hermano y amigo que la vida me pudo dar. A mi papá y a mi hermana por darme ánimo para continuar con el proceso y por confiar en mí.

A mi amado Héctor, por ser el mejor novio, amigo y compañero en la vida y en esta maestría, por escucharme, consentirme, animarme y cuidarme. Por creer siempre en mí incluso cuando yo no podía.

A mis amigos Noemi, Fernando, Karen, Mónica, Claudio y Karla, por darme consejos, apoyo técnico, ánimos y por ser mis compañeros de tantos viajes y grandes experiencias. Por permitirme ser parte de sus vidas. Gracias por estar en los momentos importantes y por su sinceridad en todo momento.

A Marisol, Liz y Ale por ser las mejores compañeras de clase, gracias por compartir siempre su conocimiento y por su apoyo en la parte técnica del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Marco y Dennisse, por darme ánimo cada que lo necesitaba.

A mis niños de servicio Julieta, Cinthya, Ernesto, Gaby y Majo por su apoyo técnico en la ejecución de los experimentos. Especialmente a Ernesto y Gaby por compartir su tiempo, su gran empeño y ánimo de aprender, les estaré eternamente agradecida. Gracias por hacer de mi proyecto parte de ustedes, no dudo que seguirán aprendiendo y tendrán mucho éxito, espero haber contribuido a su formación.

A Conahcyt por el apoyo económico que me brindó durante los dos años de maestría, sin el apoyo esto no hubiera sido posible.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| Resumen | v |
| Abstract..... | vii |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. ANTECEDENTES..... | 3 |
| II.1 Cerveza artesanal | 3 |
| II.1.1 Características generales del proceso y producto | 3 |
| II.1.2 Contaminación microbiana en el proceso de elaboración..... | 4 |
| II.2 Bacterias ácido lácticas (BAL) y la producción de aminas biogénicas (AB) en cerveza artesanal. | 5 |
| II.2.1 Efectos toxicológicos de las AB | 8 |
| II.2.2 Contenido de AB y límites permisibles en cerveza artesanal | 9 |
| II.2.3 Control de la presencia y formación de AB en cerveza artesanal..... | 11 |
| II.3 Bacteriófagos | 11 |
| II.3.1 Características generales | 12 |
| II.3.2 Mecanismos de infección y ciclos de vida | 15 |
| II.3.2 Técnicas de enumeración..... | 16 |
| II.3.3 Técnicas para el aislamiento, purificación y caracterización..... | 17 |
| II.3.3 Aplicación en la industria alimentaria..... | 20 |
| II.3.4 Aplicación en cerveza artesanal | 21 |
| III. OBJETIVOS | 23 |
| III.1 Generales..... | 23 |
| III.2 Específicos | 23 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| IV.1 Materiales | 24 |
| IV.1.1 Equipo | 24 |
| IV.1.2 Medios de cultivo..... | 24 |
| IV.1.3 Soluciones..... | 24 |
| IV.1.4. Reactivos..... | 25 |
| IV.1.5 Material biológico | 25 |
| IV.2 Métodos | 26 |

| | |
|---|----|
| IV.2.1 Procedimientos generales | 26 |
| IV.2.1.1 Activación y lavado de cepas de BAL productoras de AB. | 26 |
| IV.2.1.2 Recuento en placa de células viables | 26 |
| IV.2.1.3 Recuento de bacteriófagos por el método agar en doble capa..... | 26 |
| IV.2.2 Optimización de la técnica de aislamiento, enriquecimiento y conservación de bacteriófagos | 27 |
| IV.2.3 Obtención de bacteriófagos..... | 28 |
| IV.2.3.1 Recolección de muestras..... | 28 |
| IV.2.3.2 Aislamiento y purificación de bacteriófagos | 28 |
| IV.2.4 Identificación de bacteriófagos por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) | 29 |
| IV.2.5 Evaluación del efecto antimicrobiano de los bacteriófagos sobre BAL productoras de AB. | 30 |
| IV.2.5.1 Determinación del rango de hospederos | 30 |
| IV.2.5.2 Cinética de inhibición de desarrollo bacteriano..... | 31 |
| IV.2.6 Evaluación del efecto de pH, contenido de alcohol y concentración del lúpulo en el efecto de inhibición de los bacteriófagos sobre las BAL productoras de AB | 31 |
| IV.2.7 Evaluación del efecto antimicrobiano de bacteriófagos seleccionados sobre cepas de BAL y su producción de AB durante la fermentación de mosto de cerveza | 33 |
| IV.2.9 Análisis estadístico | 34 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSION | 35 |
| V.1 Propagación y conservación de los bacteriófagos | 35 |
| V.2 Aislamiento y purificación de bacteriófagos | 38 |
| V.3 Identificación de bacteriófagos mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)..... | 42 |
| V.4 Determinación del rango de hospederos | 45 |
| V.5 Cinética de inhibición de desarrollo bacteriano..... | 47 |
| V.6 Evaluación del efecto de pH, contenido de alcohol y concentración del lúpulo en el efecto de inhibición de los bacteriófagos sobre las BAL productoras de AB | 49 |

| | |
|---|----|
| V.7 Evaluación del efecto antimicrobiano de bacteriófagos seleccionados sobre cepas de BAL y su producción de AB durante la fermentación de mosto de cerveza..... | 55 |
| VI. CONCLUSIONES | 62 |
| VII. REFERENCIAS..... | 63 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura de las aminas biogénicas más relevantes en alimentos. (Sentellas et al., 2016) | 6 |
| Figura 2. Formación de aminas biogénicas. AR (Arginina); Glu (Glutamina); His (Histidina); Lys (Lisina); Orn (Ornitina); Try (Triptófano); Tyr (Tirosina)..... | 7 |
| Figura 3. Morfología de bacteriófagos representativa para cada familia..... | 13 |
| Figura 4. Aplicación de los bacteriófagos en la industria alimentaria..... | 20 |
| Figura 5. Clasificación de las placas o zonas de lisis..... | 30 |
| Figura 6. Micrografía electrónica del fago ME2 que infecta a la cepa 5 de <i>Leuconostoc citreum</i> . Escala 100 nm. | 31 |
| Figura 7. Efecto de los cultivos en la concentración de bacteriófagos. | 35 |
| Figura 8. Efecto del agar bacteriológico en la conservación de bacteriófagos a 4°C. | 37 |
| Figura 9. Morfología de las placas de los bacteriófagos después de propagación con cepa su susceptible a) 8M2, b) M2M, c) 44M2 y d) 44M3..... | 41 |
| Figura 10. Micrografías obtenidas por TEM de los fagos a) 8M2, b) M2M, c) 44M2 y d) 44M3..... | 44 |
| Figura 11. Rango de hospederos y calidad de lisis de los cinco bacteriófagos evaluados. | 46 |
| Figura 12. Cinética de inhibición de desarrollo bacteriano a) fago 44M2 sobre <i>L. brevis</i> (C7) y b) fago 44M3 sobre <i>L. brevis</i> (C18).. | 48 |
| Figura 13. Comportamiento de <i>L. brevis</i> a) C7 y b) C18..... | 50 |
| Figura 14. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para a) C7 y b) C18.. | 51 |
| Figura 15. Reducción de las poblaciones de <i>L. brevis</i> a) C7 por el fago 44M2 y b) C18 por el fago 44M3 en los tratamientos y el control a las 12 y 24 h..... | 53 |
| Figura 16. a) Evolución de la fermentación de mosto para cerveza. Características químicas de la cerveza al final de fermentación b) Porcentaje de alcohol, c)pH y d) acidez en g/L de ácido láctico..... | 57 |
| Figura 17. a) Cinética de <i>L. brevis</i> C18 durante la fermentación del mosto en el tratamiento y los controles. b) Concentraciones de AB encontradas en el tratamiento y los controles..... | 58 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Aminas biogénicas y sus efectos toxicológicos | 8 |
| Tabla 2. Tipos de bacteriófagos | 14 |
| Tabla 3. Métodos para la enumeración de bacteriófagos | 16 |
| Tabla 4. Métodos de caracterización de bacteriófagos | 18 |
| Tabla 5. BAL productoras de AB | 25 |
| Tabla 6. Composición de las mezclas de cepas para el aislamiento de bacteriófagos. | 28 |
| Tabla 7. Formulación de cada tratamiento basado en el diseño factorial fraccionado. | 32 |
| Tabla 8. Bacteriófagos aislados a partir de las muestras de superficies, agua, alimentos y residuos recolectados, para cada mezcla de bacterias evaluadas. | 39 |
| Tabla 9. Taxonomía y morfología de los fagos aislados..... | 43 |

Resumen

La cerveza artesanal es susceptible a la contaminación por las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales pueden producir aminas biogénicas (AB). Estos compuestos pueden generar efectos toxicológicos que comprometen la salud de los consumidores. Los bacteriófagos se han señalado como potenciales agentes de biocontrol y bioconservación en alimentos contra diversas bacterias. El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar bacteriófagos con actividad inhibitoria sobre BAL productoras de AB *in vitro* y durante el proceso de fermentación de cerveza artesanal. Se tomaron 45 muestras de superficies, agua, alimentos y residuos, de los cuales se aislaron, propagaron, purificaron e identificaron microscópicamente 4 bacteriófagos: 8M2, M2M, 44M2 y 44M3 (familia Siphoviridae, morfotipo B1). Posteriormente se identificó el rango de hospederos de cada bacteriófago mediante la prueba de puntos con 12 cepas de BAL productoras de AB. Los bacteriófagos 44M2 y 44M3 mostraron un amplio rango de hospederos y alta calidad de lisis al infectar a más de dos diferentes géneros y especies de BAL. Los fagos 44M2 y 44M3 fueron seleccionados y evaluados en una cinética de inhibición bacteriana en caldo MRS sobre las cepas C7 y C18 de *Levilactobacillus brevis*, respectivamente, cepas con alta producción de AB. El fago 44M2 redujo hasta 5.12 ± 0.27 Log UFC/mL de la cepa C7 y el fago 44M3 redujo hasta $> 8.31 \pm 0.15$ Log UFC/mL de la cepa C18. Posteriormente, se evaluó el efecto del pH, concentración de etanol y lúpulo sobre la actividad de los fagos en caldo MRS modificado. Las condiciones potenciaron la actividad inhibitoria de ambos bacteriófagos sobre sus respectivas cepas con respecto al control sin inhibidores, logrando reducciones de hasta 4.47 ± 0.16 y 3.59 ± 0.22 Log UFC/mL a las 24 horas, sobre la cepa C7 y C18, respectivamente. Finalmente, se evaluó la actividad inhibitoria del fago 44M3 sobre la cepa C18 de *L. brevis* en mosto fermentado durante 13 días, observamos que la microbiota nativa produce AB y que la cepa de BAL compite por nutrientes y al reducirla con el fago se favorece la producción de AB generadas por la microbiota.

Palabras clave: Cerveza artesanal, bacterias ácido lácticas, aminas biogénicas, bacteriófagos, biocontrol.

Abstract

The craft beer is susceptible to contamination by lactic acid bacteria (LAB), which can produce biogenic amines (BA). These compounds may have toxicological effects that compromise consumer health. Bacteriophages have been identified as potential biocontrol and biopreservation agents in food against various bacteria. The aim of this study was to isolate and characterize bacteriophages with inhibitory activity against BA-producing LAB in vitro and during the craft beer fermentation process. Forty-five samples from surfaces, water, food, and residues were collected, from which 4 bacteriophages: 8M2, M2M, 44M2, and 44M3 (Siphoviridae family, morphotype B1) were isolated, propagated, purified, and microscopically identified. Subsequently, the host range of each bacteriophage was determined using the spot test with 12 strains of BA-producing LAB. Bacteriophages 44M2 and 44M3 exhibited a broad host range and high lytic activity, infecting more than two different genera and species of LAB. Phages 44M2 and 44M3 were selected and evaluated in a bacterial inhibition kinetic assay in MRS broth against strains C7 and C18 of *Levilactobacillus brevis*, respectively (strains with high BA production). Phage 44M2 reduced up to 5.12 ± 0.27 Log CFU/mL of strain C7, while phage 44M3 reduced up to $> 8.31 \pm 0.15$ Log CFU/mL of strain C18. Subsequently, the effect of pH, concentration of ethanol and hops on phage activity in modified MRS broth was evaluated. These conditions enhanced the inhibitory activity of both bacteriophages against their respective strains compared to the control without inhibitors, achieving reductions up to 4.47 ± 0.16 and 3.59 ± 0.22 Log CFU/mL after 24 hours for strains C7 and C18, respectively. Finally, the inhibitory activity of phage 44M3 against strain C18 of *L. brevis* was evaluated in fermented wort for 13 days. It was observed that the native microbiota produced BA and that the LAB strain competed for nutrients, favoring BA production when C18 was reduced by the phage

Keywords: Craft beer, lactic acid bacteria, biogenic amines, bacteriophages, biocontrol.

I. INTRODUCCIÓN

La cerveza es una bebida ampliamente consumida en el mundo y en años recientes la cerveza artesanal ha ganado gran popularidad. En México, la producción de cerveza artesanal experimentó un crecimiento importante entre los años 2011 y 2017 y se estima que en el 2018 se tuvo una producción de 265, 405 hL y un valor de venta de 61.4 millones de dólares (Baiano, 2021; Guerra-Tamez et al., 2021).

Sin embargo, el proceso de producción de cerveza artesanal es más susceptible a la contaminación microbiana debido a la ausencia de etapas como la pasteurización y la microfiltración, así como la mala calidad higiénica de las materias primas y la diversidad de ingredientes empleados que favorecen el ingreso y la sobrevivencia de ciertos microorganismos como las bacterias ácido lácticas (BAL) (Garofalo et al., 2015).

Este grupo de bacterias tiene la capacidad de tolerar las condiciones adversas que posee la cerveza, así como persistir en las superficies de los equipos y su actividad puede estar asociada a la producción de aminas biogénicas (AB) (Poveda et al., 2017). Estos compuestos de bajo peso molecular pueden causar problemas a la salud en algunas personas incluso si se ingieren en cantidades relativamente bajas (Ladero et al., 2010).

En cuanto al control de la síntesis de aminas biogénicas los productores se enfocan en mantener la calidad higiénica de las materias primas y la cocción que ayuda a reducir las poblaciones microbianas, sin embargo, estas pueden persistir en el medio y en la superficie de los equipos, por lo que es necesario evitar la sobrevivencia de estos durante la fermentación y el almacenamiento (Nuñez et al., 2015; Simon Sarkadi, 2017). En estas etapas se pueden aplicar alternativas basadas en la bioconservación, entre las cuales se encuentra el uso de bacteriófagos (Edyta Kordialik-Bogacka, 2022; Garvey, 2022).

Los bacteriófagos, que son virus que infectan a las bacterias, ya han sido evaluados a nivel laboratorio contra bacterias que causan el deterioro en cerveza artesanal,

sin embargo, estos estudios se limitan al aislamiento, caracterización y secuenciación genómica de los fagos, así como a la evaluación de la actividad inhibitoria de estos en medios de cultivo y no en el producto (Feyereisen et al., 2019; Kelly et al., 2012). Por otro lado, dentro del cuerpo académico se cuenta con un estudio previo bajo el mismo fin, en donde se evaluó la actividad inhibitoria de fagos aislados contra bacterias deterioradoras como *L. pentosus*, *Lc. citreum* y *B. cereus* en cerveza comercial tipo pilsner (López-Gazucho et al., 2023). Estos estudios resaltan el uso potencial de los bacteriófagos como un bioconservador en cerveza artesanal.

Además, es importante mencionar que actualmente existen cocteles de bacteriófagos contra patógenos de humanos que cuentan con el estatus de sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS) otorgado por la Administración de alimentos y medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) (Moye et al., 2018).

Por ello, el objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar bacteriófagos con actividad inhibitoria sobre BAL productoras de AB *in vitro* y durante el proceso de fermentación de cerveza artesanal.

II. ANTECEDENTES

II.1 Cerveza artesanal

El término “cerveza artesanal” aún no cuenta con una definición general aceptada, ya que depende y varía entre las tradiciones de elaboración de cada país, no obstante, se han empleado criterios asociados al proceso de producción, tamaño o escala de producción, antigüedad y tradición para las definiciones existentes (Garavaglia & Swinnen, 2017).

En los últimos años, su consumo ha aumentado debido a que los consumidores han mostrado gran interés en atributos sensoriales como sabor, aroma y consistencia, lo que pone en ventaja a los productos artesanales. En este sentido Estados Unidos, Italia, Francia, México y Brasil han experimentado un aumento de la producción y consumo de cerveza artesanal (Carvalho et al., 2018).

En México específicamente las cervecerías artesanales experimentaron un crecimiento importante en cuanto a su producción entre el año 2011 y 2017, con alrededor de 600 cervecerías activas y una producción de 265, 405 hL en el último año reportado (Guerra-Tamez et al., 2021). A nivel nacional Querétaro es uno de los cinco grandes productores de cerveza artesanal y actualmente tiene a dos de las cervecerías más grandes del país (Municipio de Querétaro, 2019).

II.1.1 Características generales del proceso y producto

La cerveza se elabora a partir de 4 ingredientes principales: agua, malta, lúpulo y levadura, la composición del producto final dependerá de los componentes presentes en las materias primas y la forma en la cual los sabores derivados de estas se combinan durante el proceso de elaboración (Parker, 2012). Este comienza con el macerado, el cual consiste en mezclar la malta molida y adjuntos (sales y enzimas suplementarias), con adición de agua a temperatura controlada, el cual tiene como objetivo la activación de enzimas que convierten compuestos complejos en simples (Briggs et al., 2004). Posteriormente en la ebullición o cocción del mosto

se inactivan las enzimas, se reducen las poblaciones microbianas el mosto y se añade el lúpulo. En la fermentación alcohólica se añade la levadura para hacer la conversión de azúcares a etanol y otros compuestos secundarios, mientras que durante la maduración se eliminan compuestos indeseables. La filtración y estabilización eliminan la levadura residual, turbidez y entre otros compuestos. Finalmente, el llenado o envasado tiene como objetivo conservar y proteger a la cerveza. Las materias primas como el proceso tienen gran impacto en el carácter final de la bebida y a su vez permite la gran diversidad de estilos de cerveza (Wunderlich & Back, 2009).

Además, el producto final posee características que le confieren poca susceptibilidad a la actividad microbiana gracias al contenido de etanol (hasta 10% v/v), compuestos amargos del lúpulo (aproximadamente de 17-55 ppm de iso- α -ácidos), pH bajo (3.9-4.4), dióxido de carbono disuelto (aprox. 0.5 % p/p), baja concentración de oxígeno (0.1 ppm) y escasa concentración de sustancias nutritivas (Menz et al., 2009).

II.1.2 Contaminación microbiana en el proceso de elaboración

A pesar de que la cerveza posea características que la hacen una bebida intrínsecamente segura, el proceso de producción de cerveza artesanal suele ser más susceptible a la contaminación microbiana, en comparación con el proceso de producción industrial, debido al empleo de una mayor diversidad de ingredientes como frutas, hierbas, miel y especias; o derivado de una deficiente calidad de los mismos, que aumentan el riesgo de introducir microbiota que contribuye a la contaminación (Sadler, 2019). Adicionalmente, el omitir etapas de proceso como la pasteurización y la microfiltración, con la finalidad de preservar la calidad sensorial y nutricional de la cerveza, se ve favorecida la sobrevivencia y actividad de los microorganismos (Capitello & Maehle, 2020).

Las etapas del proceso en las que el producto se ve comprometido se encuentran justo después de hervir el mosto. Mientras la temperatura del sistema desciende

para dar paso a la fermentación, cualquier bacteria e incluso algunas levaduras silvestres que se encuentre presentes en las superficies, tienen la oportunidad de multiplicarse en el medio durante los primeros días de la fermentación (Hill, 2016).

El mosto inoculado representa una oportunidad de desarrollo para las bacterias, ya que contiene fuentes de azúcar fermentables como: maltosa, fructosa, glucosa, sacarosa, maltotriosa y maltotetraosa. Además de aminoácidos, proteínas y péptidos como fuente de nitrógeno; lípidos como esteroides y ácidos grasos; minerales como azufre, potasio, fósforo y zinc, algunas vitaminas como biotina, ácido pantoténico, ácido nicotínico y tiamina (Holbrook, 2019).

Entre las bacterias Gram positivas que contaminan el proceso de producción, se encuentran las pertenecientes a las bacterias ácido lácticas (BAL) (Suzuki, 2015). Si bien, estas bacterias están relacionadas al deterioro en cerveza y no se consideran patógenas al ser humano, el motivo de preocupación relacionado a su presencia es la capacidad que tienen algunas cepas para producir aminas biogénicas (AB) durante los procesos de fermentación (Nuñez et al., 2015).

II.2 Bacterias ácido lácticas (BAL) y la producción de aminas biogénicas (AB) en cerveza artesanal.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se encuentran presentes en una amplia variedad de alimentos y bebidas fermentadas, a menudo suelen combinarse con otras especies para generar productos. Sin embargo, en la cerveza son de los principales grupos microbianos que contaminan el proceso de producción. Esto debido a su capacidad para formar biopelículas en los equipos y persistir en las superficies, así como su habilidad para resistir a los iso- α -ácidos del lúpulo (compuesto antimicrobiano) (Rodhouse & Carbonero, 2019).

Además, su actividad metabólica se considera la principal fuente de producción de aminas biogénicas (AB), siendo estos los contaminantes químicos mayormente encontrados en cerveza artesanal (Ciont et al., 2022). Las AB (Figura 1) son bases

orgánicas nitrogenadas, no volátiles, de bajo peso molecular, que se producen principalmente por la descarboxilación de aminoácidos (Wójcik et al., 2021).

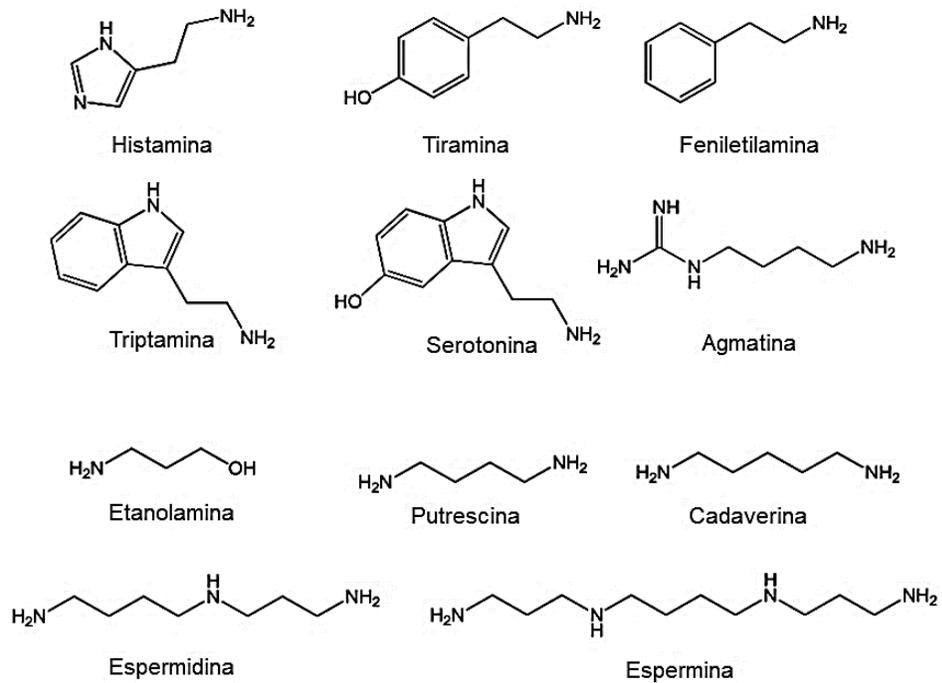


Figura 1. Estructura de las aminas biogénicas más relevantes en alimentos.
(Sentellas et al., 2016)

La fermentación involucra condiciones de estrés en las BAL como: la acidificación y el pH bajo, estos a menudo limitan el metabolismo de carbohidratos por parte de las BAL. En consecuencia, les resulta difícil generar energía para sus funciones vitales por lo que requieren de adaptaciones metabólicas para sobrevivir y desarrollar. Por ello, el catabolismo de aminoácidos les ayuda a contrarrestar el estrés ácido y generar energía adicional (Figura 2). El glutamato, la glutamina y la arginina son aminoácidos que desempeñan un papel importante en la homeostasis del pH y la supervivencia de las BAL durante su fase estacionaria en los procesos de fermentación (Longo & Spano, 2019). El catabolismo de la arginina está relacionado con la producción de agmatina y putrescina en BAL, a través de dos rutas: la ruta ADI y la descarboxilación de aminoácidos. La ruta ADI cuyas funciones son: proporcionar energía por la fosforilación del sustrato, suministrar fosfato de

carbamilo para la síntesis de citrulina o pirimidinas y proteger contra el daño causado por el ácido, produciendo ornitina, ATP, CO₂ Y NH₄⁺ (Saguir et al., 2019).

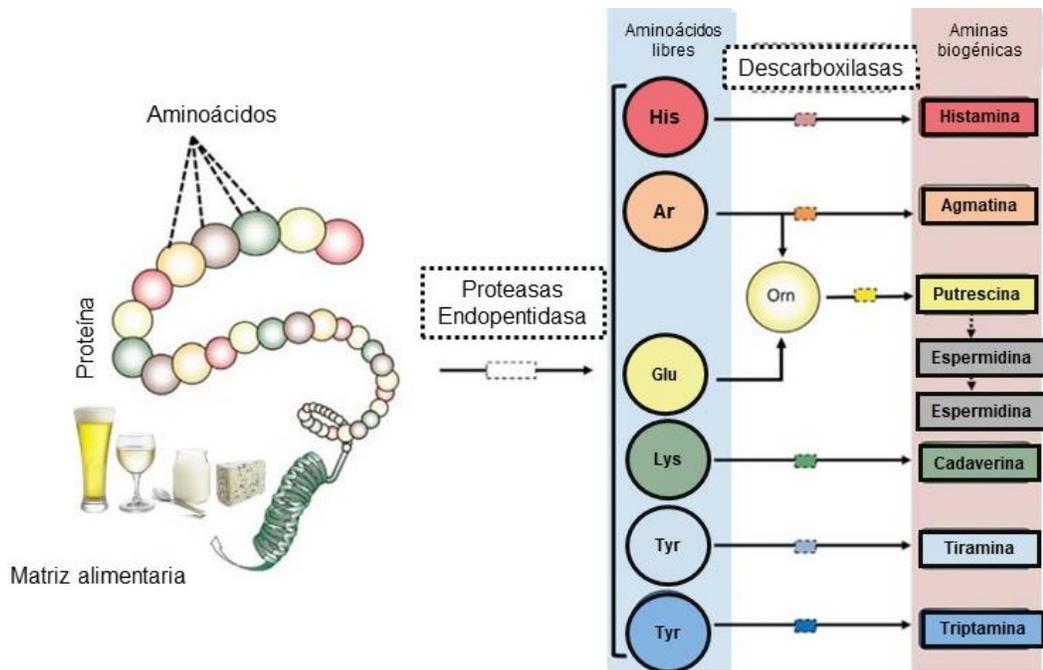


Figura 2. Formación de aminas biogénicas. AR (Arginina); Glu (Glutamina); His (Histidina); Lys (Lisina); Orn (Ornitina); Try (Triptófano); Tyr (Tirosina).
(de la Torre & Conte-Junior, 2018)

Por su parte la descarboxilación de aminoácidos, tiene prioridad sobre la ruta ADI, en donde la arginina y ornitina se pueden descarboxilar directamente a agmatina y putrescina por la actividad de las enzimas descarboxilasas, así mismo a través de esta ruta aminoácidos como lisina, triptófano, tirosina e histidina pueden generar cadaverina, triptamina, tiramina e histamina respectivamente (Wang et al., 2021). Brevemente, la descarboxilación consiste en transportar a la célula un aminoácido, descarboxilarlo y consumir un protón intracelular, de esta manera se aumenta la alcalinidad del citoplasma, mientras que el producto generado (AB) se exporta desde la célula hacía el medio exterior. Así mismo el acoplamiento que tiene al transportador electrogénico permite la generación de ATP (Zuljan et al., 2016).

Entre las BAL relacionadas a la producción de AB en cerveza, se encuentran las cepas heterofermentativas de *Levilactobacillus brevis* que producen tiramina y ornitina; *Fructilactobacillus lindneri* y *Secundilactobacillus paracollinoides* que producen ornitina e histamina respectivamente y *Leuconostoc mesenteroides* y *Enterococcus faecium* que producen tiramina, por mencionar algunas (Barbieri et al., 2019; Poveda et al., 2017). Así mismo, las AB no sólo pueden generarse durante la etapa de fermentación, sino durante el almacenamiento del producto, especialmente cuando este es prolongado (Lorencová et al., 2020).

II.2.1 Efectos toxicológicos de las AB

La presencia de aminas biogénicas en bebidas fermentadas alcohólicas es común y representan un peligro potencial para la salud de los consumidores, ya que el etanol es un inhibidor de la actividad de las enzimas mono (MAO) y diamino oxidasas (DAO), las cuales se encargan de la detoxificación de AB en la mucosa intestinal, además estos compuestos no se reducen con tratamientos térmicos. Por lo que las concentraciones se pueden mantener en el organismo y promover su efecto tóxico en diferentes órganos (Visciano & Schirone, 2022).

A continuación, se muestran los efectos toxicológicos de las AB comúnmente encontradas en alimentos (Tabla 1):

Tabla 1. Aminas biogénicas y sus efectos toxicológicos

| Aminas biogénicas | Efectos toxicológicos |
|-------------------|--|
| Histamina | <p>Erupciones, edemas (párpados), urticaria, prurito e inflamación localizada en sistema tegumentario y músculos lisos.</p> <p>Enfermedad gastrointestinal (náuseas, vómitos, diarrea y malestar estomacal).</p> <p>Neurológicos como: dolor de cabeza, palpitaciones, enrojecimiento, hormigueo, ardor y picazón.</p> |

| | |
|---|---|
| | Vasos sanguíneos (dolor de cabeza, secreción nasal, broncoespasmo, asfixia y enfermedad respiratoria grave) |
| Tiramina, feniletilamina y triptamina | Vasoconstricción que conduce a la hipertensión. Dilatación de pupilas y tejidos palpebrales, induce lagrimeo y salivación, aumenta la respiración y eleva las concentraciones de glucosa en sangre, hemorragias cerebrales e insuficiencia cardíaca (tiramina). Necrosis celular (feniletilamina) y apoptosis (triptamina). |
| Putrescina, cadaverina, espermidina y espermidina | Evitan la multiplicación celular y estimulan la apoptosis. Hipotensión, bradicardia, disnea y parálisis de las extremidades. Inhiben a las enzimas (mono y diamino oxidasas) que ayudan a la desintoxicación de histamina y tiramina. |

(Omer et al., 2021)

La AB con mayor toxicidad en humanos es la histamina debido a su potencial respuesta alérgica o inmunológica en personas sensibles, seguida por la tiramina, mientras que la putrescina y la cadaverina potencian sus efectos toxicológicos, así mismo estas últimas pueden reaccionar con los nitritos y formar nitrosaminas carcinogénicas (Ekici & Omer, 2020).

II.2.2 Contenido de AB y límites permisibles en cerveza artesanal

En general, las AB mayormente detectadas en cerveza artesanal y relacionadas al metabolismo de las BAL son la tiramina, cadaverina, putrescina, 2-feniletilamina y la histamina. Esta última en concentraciones normales se encuentra entre los 100 a 300 µg/L, dependiendo del estilo de cerveza (Ciont et al., 2022).

Estudios recientes, como el de Redruello et al. (2017), reportan diferentes concentraciones de AB en 11 muestras de cerveza artesanal de los estilos pale lager, dark lager, pale ale y dark ale, las cuales oscilaron entre los 0.14 y 58.30 mg/L

para tiramina, 1.59 y 4.05 mg/L para putrescina, 0.41 y 0.91 mg/L para cadaverina, 0.33 mg/L para histamina y 0.36 para 2-feniletilamina.

Mientras que, Poveda, (2019) reportó concentraciones menores de tiramina comparadas con las reportadas por Redruello. En su estudio evaluó 26 muestras de cerveza artesanal de los estilos pale, dark, red y wheat pale, en donde las concentraciones fueron de 0.0 – 4.60 mg/L para tiramina, 3.70 – 8.90 mg/L para putrescina, 0.17 – 1.10 mg/L para cadaverina, 0.50 – 3.9 mg/L para histamina y 0.0 – 0.93 mg/L para 2-feniletilamina.

Otros autores, como Angulo et al. (2020) reportan concentraciones que van desde trazas a 1.13 mg/L de tiramina, 9.48 – 72.18 mg/L de putrescina, trazas de cadaverina y 0.0 – 1.05 mg/L de 2-feniletilamina; Bertuzzi et al. (2020) reportan concentraciones de 0.66 – 1.65 mg/L de tiramina, 3.32 – 5.61 mg/L de putrescina, 0.42 – 0.70 mg/L de cadaverina y 0.15 – 0.31 de histamina. Nalazek-Rudnicka et al. (2021) reportan 0.36 – 31.71 mg/L de tiramina, 3.69 – 12.20 mg/L de putrescina, 0.25 – 3.64 mg/L de cadaverina, 0.05 – 4.9 mg/L de histamina y 0.0 – 0.55 mg/L de 2-feniletilamina. Las altas concentraciones de putrescina, en comparación con las otras aminas, están relacionadas a que esta AB no sólo puede formarse durante el proceso de fermentación por la actividad metabólica de las BAL, su origen también puede provenir de las materias primas, específicamente de la malta o el lúpulo (Papageorgiou et al., 2018).

Aunque estos compuestos se encuentren presentes en las bebidas alcohólicas fermentadas y representen una amenaza a la salud de los consumidores, aún se carece de legislación que establezca el límite legal máximo. Hasta el momento solo se tienen recomendaciones acerca de los límites legales para la histamina en bebidas alcohólicas el cual es de 2 mg/L (Ekici & Omer, 2020). Los límites legales que se tienen para la histamina son para peces escómbridos (200 mg/kg) y productos pesqueros (400 mg/kg) (Biological Hazards (BIOHAZ), 2011).

Establecer el límite preciso de la toxicidad de las AB en un alimento específico es una tarea compleja, ya que su efecto no se limita únicamente a su presencia, sino que también está condicionado por la presencia de otros compuestos, así como por la capacidad de desintoxicación propia de cada persona (Jairath et al., 2015).

II.2.3 Control de la presencia y formación de AB en cerveza artesanal

Para controlar la presencia y formación de AB en la cerveza, los productores se enfocan en emplear materias primas de alta calidad higiénica y mantenerla a través del almacenamiento adecuado; el uso de cultivos iniciadores (levaduras) seleccionados (Prester, 2016), el diseño de una planta que cumpla y favorezca las condiciones higiénicas, la limpieza y desinfección de instalaciones y equipos (Rodhouse & Carbonero, 2019), la implementación del programa de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en inglés), el cual se basa en los requisitos legales para los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento y las Buenas Prácticas de Manufactura, permiten reducir la incidencia de microorganismos productores en el proceso y el producto (Ciont et al., 2022). Además, la cocción ayuda a reducir las poblaciones microbianas con capacidad potencial de producción AB. No obstante, después de esta etapa los microorganismos que hayan sobrevivido o se encuentren en las superficies de los equipos pueden desarrollar en el mosto durante la fermentación (S. A. Kim et al., 2015).

Por ello, es necesario buscar alternativas que puedan aplicarse después de la cocción del mosto, con el objetivo de reducir las poblaciones microbianas y por tanto la producción de AB. En estas etapas se pueden aplicar alternativas basadas en la bioconservación, dentro de las cuales se encuentra el uso de bacteriófagos (Garvey, 2022).

II.3 Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan a las bacterias, se consideran como reguladores ecológicos de los ecosistemas microbianos, son las entidades biológicas replicantes más abundantes en la tierra y posiblemente los virus más

antiguos (Paillet & Dugat-Bony, 2021). Estos se encuentran de manera natural en el cuerpo humano formando parte de la microbiota, en ambientes marinos el cual contiene alrededor de 4×10^{30} partículas de virus, en el suelo, en alimentos y aguas de desecho; así como en plantas de tratamiento de agua, en la industria alimentaria como agentes de biocontrol o como contaminantes de cultivos iniciadores, en laboratorios de ingeniería de fagos y en formulaciones farmacéuticas (Batinovic et al., 2019).

II.3.1 Características generales

El tamaño de los fagos se encuentra entre los 20 a 400 nm, pero comúnmente oscila entre los 24 y 200 nm. Los bacteriófagos típicos poseen cabeza (o cápside) en forma icosaédrica (formada por subunidades proteicas llamadas protómeros), son filamentosos y tienen cola (aproximadamente el 96% de los fagos reportados), la cual interactúa con los receptores específicos de su huésped bacteriano (Maimaiti et al., 2023; Sharma et al., 2017).

Dentro de los bacteriófagos menos comunes se encuentran los conocidos como CFP que se caracterizan por ser cúbicos (simetría cúbica y forma icosaédrica), filamentosos o pleomórficos (aproximadamente menos del 4%). Algunos pueden contener lípidos en la envoltura y componentes internos, lo que los hace sensibles al éter y al cloroformo. Además, los bacteriófagos pueden componerse de ADN o ARN de simple (ss) o doble cadena (ds) (Ackermann, 2009). La estructura de los fagos presenta gran variación, por lo cual un pequeño número de las morfologías existentes se encuentra representada en la literatura (Figura 3).

Los fagos pertenecientes al orden de los Caudovirales se caracterizan por que poseen cola helicoidal y generalmente provista de estructuras que les permiten la fijación al huésped como la placa base, espículas o fibras, dentro de este orden se incluyen tres familias: Myoviridae (cola contráctil y rígida), Podoviridae (cola corta y no contráctil) y Siphoviridae (cola no contráctil, filamentosa y larga), las cabezas pueden ser icosaédricas o alargadas. Dentro de los fagos sin cola se incluyen a la

familia Plasmaviridae, Tectiviridae y Cystoviridae, mientras que dentro de los fagos filamentosos se encuentra a la familia Inoviridae (Dennehy & Abedon, 2021; O'Connell et al., 2021). En la Tabla 2 se pueden encontrar a mayor detalle las características de los fagos con cola y sin cola, así como algunos de los fagos más representativos en la literatura para cada familia.

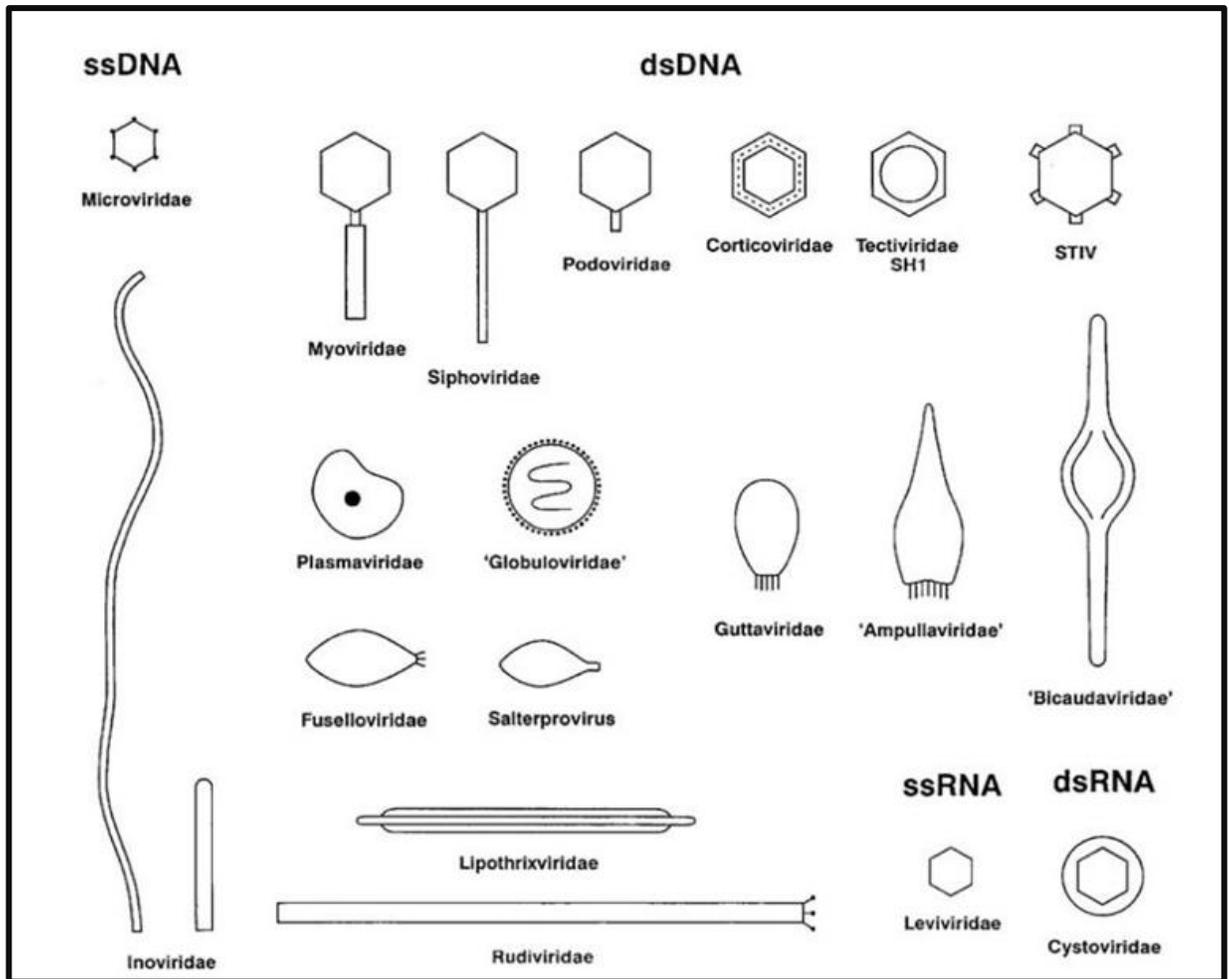


Figura 3. Morfología de bacteriófagos representativa para cada familia.

(Ackermann, 2009)

Tabla 2. Tipos de bacteriófagos

| Familia | Fagos representativos | Morfología típica | Dimensiones (nm)* | Genoma |
|----------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------------|
| Myoviridae | Mu, P1, P2, SPO1, T4 | Cola | Cabeza: 50 – 110 Cola: (80-) 95-111 (-455) x 16-20 | dsDNA |
| Siphoviridae | C2, ØC31, L5, N15, T1, T5 | Cola | Cabeza: 60 Cola: (65-) 150 (-570) x /7-) 8 (-10) | dsDNA |
| Podoviridae | Ø29, N4, P22, T7 | Cola | Cabeza: 60 Cola: 20 x 8 | dsDNA |
| Corticoviridae | PM2 | Isométrica, membrana interna | 56 | dsDNA circular, superenrollado |
| Plasmaviridae | L2 | Esférica a pleomórfica, con envoltura | (50-) 80 (-125) | dsDNA circular, superenrollado |
| Tectiviridae | PRD1 | Isométrica con membrana interna | 66 | dsDNA |
| Inoviridae | M13 (Inovirus), MV-L51 (Plectovirus) | Alargado | 700 – 2000 X 7 ó 70 - 280 x 10-16 | ssDNA circular sentido positivo |
| Microviridae | ØX174 | Isométrico | 25 - 27 | ssDNA circular sentido positivo |
| Cystoviridae | Ø6 | Isométrico, envuelto | 85 | dsRNA segmentado |
| Leviviridae | MS2 (Levivirus), Qβ (Allolevivirus) | Isométrico | 26 | ssRNA sentido positivo |

*Se enfatizan las dimensiones más comunes en donde es necesario.

(Modificado de Dennehy & Abedon, 2021)

II.3.2 Mecanismos de infección y ciclos de vida

Para que el ciclo de infección comience, el fago requiere de la identificación de receptores específicos que se encuentran en la superficie de la bacteria huésped. Además de otros factores que afectan a la adhesión como: tipo de bacteria (Gram positiva o negativa), virulencia y las condiciones de crecimiento. Específicamente para bacterias Gram positivas, como las BAL, el peptidoglicano, los ácidos teicoicos y los polisacáridos que se encuentren en la superficie funcionan como sitios receptores de fagos (Dowah & Clokie, 2018). Estos sitios son reconocidos por las proteínas de unión a los receptores (RBPs, por sus siglas en inglés), las cuales están ubicadas en la cola del fago (Dunne et al., 2018). La penetración del material genético en la célula bacteriana dependerá del tipo de fago, por ejemplo: Myoviridae se une irreversiblemente a la superficie bacteriana conectando la placa base con ayuda de las fibras de la cola, posteriormente con ayuda del ATP contrae la cola e inserta el material genético; a diferencia de la familia Podoviridae, que al carecer de la cola, degrada enzimáticamente parte de la membrana celular de la bacteria huésped e inserta su material genético (Sharma et al., 2017).

Una vez que se ha insertado el material genético, el ciclo de vida de los fagos puede ser lítico o lisogénico. En los fagos líticos el ciclo de vida termina con la lisis de su anfitrión. Primero provoca la inhibición del metabolismo de la bacteria y lo perturba para la producción de la progenie de fagos, finalmente para liberar los productos requiere de endolisinas, que son proteínas líticas que degradan el peptidoglucano de la pared celular bacteriana al final del ciclo lítico. El ciclo comienza de nuevo cuando los fagos generados infectan a otras células (Kazi & Annapure, 2016; Rendueles et al., 2022).

En los fagos lisogénicos, la propagación del fago es retardada al integrar su genoma viral dentro del genoma bacteriano. En esta situación, el fago protege al huésped del ataque de otros bacteriófagos, controla la expresión de genes bacterianos y promueve la transferencia de genes entre bacterias. La bacteria lisogénica después de ser infectada contiene un profago integrado en su genoma, el cual permanece

en estado de latencia y multiplica en las divisiones celulares de la bacteria. Sin embargo, en situaciones de estrés o procesos de daño celular del huésped se activa el ciclo lítico y termina con la liberación de nuevos viriones. En aplicaciones como el biocontrol, los fagos lisogénicos se consideran inadecuados, por lo que los fagos líticos son ideales para este tipo de aplicaciones (Brady et al., 2021; Harada et al., 2018).

II.3.2 Técnicas de enumeración

La enumeración de bacteriófagos se puede realizar mediante ensayos en placa permite determinar la concentración de partículas (título) de fagos infecciosos (Tabla 3). En estas técnicas se mezclan diluciones preparadas de los fagos con su bacteria huésped y se dispersan de forma uniforme en un medio de cultivo sólido. En la siembra la bacteria huésped crece sobre el medio sólido, mientras que, las partículas de fagos infecciosos lisan o inhiben el crecimiento de las células bacterianas, lo que resulta en zonas claras o translúcidas circulares denominadas “placa” o “zonas de lisis”. Las unidades de fagos infecciosos se denominan unidad formadora de placa (UFP). Dependiendo de la bacteria, una placa puede ser clara (como la placa del fago T1) o una placa con área de crecimiento lento (placa del fago M13). A este ensayo se le denomina titulación o ensayo en placas y es la base para determinar la concentración de los fagos, el aislamiento y la caracterización (Stephenson, 2016).

Tabla 3. Métodos para la enumeración de bacteriófagos

| Método | Descripción |
|--|--|
| “Superposición de agar blando”, agar en doble capa” o “doble capa” | La suspensión o dilución de bacteriófagos a cuantificar se mezcla con la bacteria hospedera en agar diluido y fundido, el cual se distribuye de manera uniforme sobre una placa con agar estándar hasta solidificación. Después de incubación las placas de lisis se distinguen por ser claras. Este método se considera |

| | |
|-----------------|---|
| | el más preciso y favorece la formación de placas de lisis grandes y con morfología definida. |
| Plaqueo directo | Este método no requiere del recubrimiento de agar diluido como el método anterior, la suspensión o dilución de fagos a cuantificar se mezcla con la bacteria hospedera y se incuba unos minutos para permitir la adhesión de los fagos a las bacterias. Después de incubación la mezcla se esparce en la placa de agar estándar y seca, posteriormente se incuba y se procede al conteo de las placas de lisis. |
| Gota | Este método es a pequeña escala y permite lograr mayor eficiencia y economía con poca pérdida de precisión en la enumeración de fagos. La preparación e inoculación de la suspensión y diluciones de fagos es similar al ensayo de plaqueo directo, sólo que, a diferencia de este, los volúmenes empleados de la mezcla de bacteria y fagos es pequeño (20 µL). |

(Kropinski et al., 2009)

Los métodos en placa sólo permiten la enumeración de fagos líticos cuyas bacterias hospederas forman céspedes uniformes en agar sólido y que producen progenie suficiente para formar placas de lisis visibles, por lo que para los fagos que no se puedan enumerar por métodos de plaqueo la microscopía electrónica, microscopía fluorescente o PCR cuantitativa, son métodos que permiten la cuantificación (Kropinski et al., 2009).

II.3.3 Técnicas para el aislamiento, purificación y caracterización

El aislamiento de bacteriófagos se puede realizar mediante dos enfoques. El primero dependiente del cultivo, en donde una muestra de interés se inocula con la bacteria(s) hospedera(s) objetivo con la finalidad de aumentar las concentraciones de los posibles bacteriófagos presentes en un medio de cultivo líquido selectivo, generalmente las bacterias que pueda contener la muestra son eliminadas antes de

la inoculación. Este paso de amplificación, propagación o enriquecimiento, no siempre se lleva a cabo, en algunos casos se procede a la detección directa de los fagos en placa. El segundo enfoque es la concentración de bacteriófagos usando equipos sofisticados y técnicas como la ultracentrifugación, precipitación y la filtración; dentro de sus ventajas es que permite la detección y cuantificación, aunque las concentraciones iniciales del fago sean muy bajas (Abedon, 2021).

Para la purificación de los bacteriófagos aislados se emplean técnicas como centrifugación a baja velocidad con cloroformo (0.1-1% v/v), filtración del sobrenadante con membranas de 0.2 o 0.45 μm , precipitación con polietilenglicol (PEG) al 8% (p/v) y 0.1 M de Cloruro de sodio (NaCl) seguido de centrifugación a 6, 700 x g /30 min, ultracentrifugación con gradiente de cloruro de cesio (CsCl) o sacarosa a velocidades que van desde los 20, 000 a 100, 000 x g / 60 o 120 min y (Abdelsattar et al., 2022). La purificación también se puede realizar a partir de las zonas de lisis que se obtienen de la detección de fagos por el método de agar en doble capa, en donde se seleccionan zonas de lisis con diferentes morfologías y tamaños, estas se resguardan en buffer sal – magnesio (buffer SM), a partir de estas placas se realiza múltiples enriquecimientos hasta obtener zonas de lisis con morfologías uniformes (Esmael et al., 2021).

Después del aislamiento y la purificación, los fagos se pueden caracterizar con base en el tipo de ácido nucleico (dsDNA, ssDNA, dsRNA o ssRNA), genómica, composición física y química, morfología, serología, métodos de inactivación (física y química) y fisiología (funcionalidad del fago y capacidad para atacar a la cepa hospedera) (Abdelsattar et al., 2022). En la Tabla 4 se muestran los métodos comúnmente empleados para la caracterización de los bacteriófagos.

Tabla 4. Métodos de caracterización de bacteriófagos

| Caracterización | Descripción del parámetro | Métodos |
|------------------------|---|---|
| Fisiológica | <u>Tamaño de explosión:</u> Se refiere al número de partículas de fago que se producen por célula infectada y | *Curva de crecimiento de un solo paso. *Microscopía electrónica de transmisión (TEM) |

| | | |
|-----------------------|---|--|
| | permite conocer la dinámica poblacional de cada bacteriófago. | |
| | <u>Rango de hospederos:</u> Permite identificar las bacterias que un bacteriófago es capaz de infectar y puede abarcar varios géneros bacterianos. | *Eficiencia de plaqueo (EOP) *Prueba de mancha o puntos |
| | <u>Periodo de latencia:</u> Periodo que transcurre entre la infección y la liberación de los bacteriófagos después de la lisis. | *Microscopía electrónica de transmisión (TEM) *Examinación turbidimétrica *Curva de crecimiento de un solo paso |
| Química y física | <u>Inactivación de la actividad lítica:</u> Se enfoca en pruebas para determinar la actividad de los fagos y su resistencia a condiciones adversas. | *Radiación UV *Exposición a químicos: metanol, etanol y propanol, dimetilformamida (DMF), ácido peracético, cloroformo, fenol, etc. *Tratamientos térmicos *Sensibilidad a diferentes pH |
| Morfológica | Permite identificar la longitud y el diámetro de la cola, la simetría de la cápside, la forma del virión, el número de capsómeros, la presencia de envoltura, las dimensiones y las proteínas internas. | *Microscopía electrónica de transmisión (TEM) *Microscopía electrónica de barrido (SEM) *Crio-microscopía electrónica (Cryo-EM) *Microscopía de fluorescencia *Microscopía de fuerza atómica (AFM) |
| Composición | Física: Peso molecular de ácidos nucleicos, densidad flotante de las proteínas. Química: Porcentaje de proteínas y lípidos, composición de lípidos, aminoácidos y secuencia de aminoácidos. | *Electroforesis de campos pulsados (PFGE) *Interesterificación |
| Genómica y genotípica | Permiten conocer si un fago tiene actividad lítica o lisogénica, ya que los fenotipos expresados durante | *PCR multiplex *Tipificación de secuencias multilocus (MLST) *Secuenciación de DNA/RNA |

| | | |
|--|---|----------------------------------|
| | el ciclo de infección están codificados en el genoma. | Illumina (MiSeq, HiSeq, NovaSeq) |
|--|---|----------------------------------|

(Abdelsattar et al., 2022)

II.3.3 Aplicación en la industria alimentaria

El uso de bacteriófagos en la agricultura y en la industria alimentaria es un área en crecimiento y evolución (Figura 4). El estudio y aislamiento de fagos ha permitido el desarrollo de estrategias para controlar infecciones bacterianas en los cultivos, enfermedades bacterianas en la acuicultura, así como la presencia de bacterias patógenas en alimentos y de bacterias deterioradoras (Ledormand et al., 2021; Sharma et al., 2017).

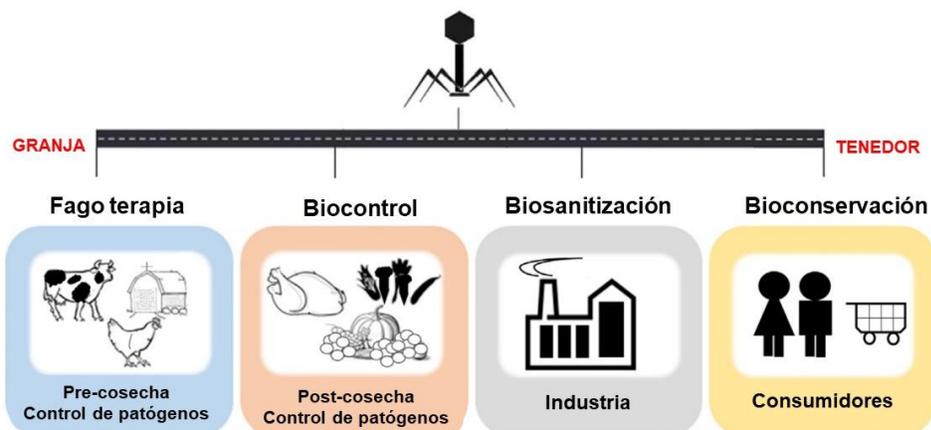


Figura 4. Aplicación de los bacteriófagos en la industria alimentaria.

(Endersen & Coffey, 2020)

Entre los estudios en donde se ha evaluado a los bacteriófagos se encuentra su aplicación como alternativa de biocontrol contra *Escherichia coli* patógena aviar (APEC) en pollo de engorda, en donde se señala que la terapia con fagos es una opción atractiva para prevenir y controlar la colibacilosis (Eid et al., 2022).

En embutidos fermentados la aplicación de bacteriocinas producidas por BAL como método de bioconservación y la aplicación de bacteriófagos sugiere una mejora adicional para la inocuidad alimentaria y valor agregado al producto (Aymerich et al., 2011). El uso en conjunto de las bacteriocinas, bacteriófagos y proteínas, como

las endolisinas, en el área de bioconservación, ya ha sido objeto de estudio, especialmente para el control de bacterias como *Listeria monocytogenes* en manzanas, jamones de cerdo, ensaladas de col, queso fresco, entre otras matrices alimentarias (Rendueles et al., 2022).

El uso de cocteles o preparaciones de fagos en la industria alimentaria tuvo su primera aprobación en el año 2006, en donde la FDA aprobó un cóctel específico de fagos para *Listeria monocytogenes* conocido como ListShield™ como aditivo alimentario. La FDA también otorgo la designación de generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) a varias formulaciones de fagos como: SalmoFresh™, PhageGuard Listex™ y PhageGuard S™. Por su parte, el departamento de agricultura (USDA, por sus siglas en inglés) incluyó diversas preparaciones de fagos en sus directrices emitidas para ingredientes seguros y adecuados en la producción de carne, aves y productos de huevo (Moye et al., 2018). Mientras que en los procesos de vinificación se proponen como alternativa al uso de dióxido de azufre (SO₂) para controlar a las poblaciones de bacterias ácido acéticas y lácticas que causan defectos en la calidad sensorial del vino (Cordero-Bueso et al., 2020).

Si bien la aplicación de fagos en la industria alimentaria se basa principalmente en el biocontrol de patógenos y de bacterias de deterioro, el estudio de nuevos enfoques señala que se podrían llegar a emplear como herramientas para el control de las comunidades microbianas y así alcanzar propiedades específicas en los productos alimentarios (Paillet & Dugat-Bony, 2021).

II.3.4 Aplicación en cerveza artesanal

Dado que los bacteriófagos pueden lisar selectivamente a las bacterias sin afectar negativamente a las levaduras, se han considerado para el control de bacterias que contaminan la fermentación alcohólica y que causan el deterioro (Seo et al., 2020).

Sin embargo, las investigaciones en cuanto a la aplicación de los bacteriófagos en cerveza artesanal son limitadas y se enfocan en el aislamiento y caracterización de fagos que infectan a bacterias deterioradoras y generalmente se limitan a ensayos

in vitro. Feyereisen et al. (2019) aislaron y caracterizaron 5 bacteriófagos que infectan a cepas de *Levilactobacillus brevis* que causan deterioro, en donde evaluaron el efecto antimicrobiano en caldo MRS y observaron que al adicionar los fagos líticos a las diferentes cepas de *L. brevis* había efectos negativos en el desarrollo impidiéndolo hasta por 32 h. Por su parte, Kelly et al. (2012) se enfocaron en la secuenciación del genoma del fago cIP1 que infecta a *Pediococcus damnosus* (deterioradora de cerveza artesanal) el cual posee maquinaria genética para expresar ciclos de vida líticos y la ausencia de genes que pudieran codificar para la producción de endotoxinas. Mientras que López-Gazucho et al. (2023) aislaron y evaluaron 3 bacteriófagos con actividad inhibitoria sobre *Leuconostoc citreum*, *Lactiplantibacillus pentosus* y *Bacillus cereus* en cerveza comercial tipo pilsner, en este evaluaron los cambios sensoriales durante el almacenamiento y las poblaciones microbianas, encontrando reducciones de 0.8 a 1.2 Log UFC/mL de las cepas bacterianas.

Estos estudios señalan las posibles aplicaciones de los bacteriófagos en cerveza artesanal para el control de poblaciones bacterianas que causan el deterioro, no obstante, su aplicación se puede enfocar a la bioconservación contra BAL que producen AB en cerveza artesanal.

III. OBJETIVOS

III.1 Generales

Caracterizar la capacidad inhibitoria de bacteriófagos sobre bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de aminos biogénicas (AB) *in vitro* y en el proceso de fermentación de cerveza artesanal.

III.2 Específicos

- I. Estandarizar el método de propagación y conservación de los bacteriófagos *in vitro*.
- II. Aislar y seleccionar bacteriófagos con capacidad de inhibición sobre BAL productoras de AB.
- III. Evaluar el efecto *in vitro* del pH, temperatura, contenido de etanol y concentración de lúpulo en la actividad inhibitoria de los bacteriófagos sobre las BAL productoras de AB.
- IV. Evaluar la eficiencia de los bacteriófagos seleccionados para reducir el desarrollo o la sobrevivencia de BAL y la producción de AB durante el proceso de fermentación de cerveza.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Materiales

IV.1.1 Equipo

- Campana de flujo laminar
- Centrifuga METRIX® Velocity 14
- Centrifuga refrigerada HERMLE®Z 323 K
- Ultracentrífuga Beckman Optima™ L-60.
- Microscopio electrónico de transmisión JEM 1400, JEOL LTD, Japón.
- Incubadora INCUBATOR® 815
- Incubadora refrigerada FOC 225E VELD SCIENTIFICA®
- Potenciómetro HANNA® pH 211
- Espectrofotómetro LAMBDA 365 UV/Vis PerkinElmer®
- HPLC Agilent Technologies XDB-C8 LC (DEPENDE DE LA MET. AMINAS)
- Detector de fluorescencia (G1321A) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

IV.1.2 Medios de cultivo

- Caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) BD Difco™
- Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) NEOGENE®
- Agar bacteriológico NEOGENE®
- Caldo Neutralizante NEOGENE®

IV.1.3 Soluciones

- Buffer SM (0.05 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.01 M MgSO₄, agar bacteriológico 0.05%, pH = 7.5)
- Solución salina isotónica (SSI) 0.85 g de NaCl / 100 mL agua destilada
- Cloruro de calcio (CaCl₂) 1 M
- Etanol 95 %
- Ácido clorhídrico (HCl) 6 N

IV.1.4. Reactivos

- Polietilenglicol 8000 Sigma Aldrich®
- Cicloheximida Sigma Aldrich®
- 2,2,4–trimetilpentano o iso–octano Fermont®

IV.1.5 Material biológico

- Cepas de BAL productoras de AB previamente aisladas de cerveza artesanal (Tabla 5).

Tabla 5. BAL productoras de AB

| Código de la cepa | Género y especie | AB producida |
|--------------------------|-------------------------------------|---|
| C4 | <i>Levilactobacillus brevis</i> | Tiramina, histamina. |
| C7 | <i>Levilactobacillus brevis</i> | Tiramina, histamina. |
| C9 | <i>Levilactobacillus brevis</i> | Histamina, tiramina, putrescina y cadaverina. |
| C11 | <i>Levilactobacillus brevis</i> | Tiramina, histamina. |
| C13 | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | Tiramina |
| C14 | <i>Levilactobacillus brevis</i> | Tiramina, histamina. |
| C18 | <i>Levilactobacillus brevis</i> | Histamina, tiramina, putrescina y cadaverina. |
| C19 | <i>Levilactobacillus brevis</i> | Histamina, tiramina, putrescina y cadaverina. |
| C20 | <i>Levilactobacillus brevis</i> | Tiramina, histamina. |
| 5 | <i>Leuconostoc citreum</i> | N/I |
| 9 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> | Putrescina |

(López-Gazucho et al., 2023; Ovalle-Marmolejo et al., 2023)

- YCH Extracto de lúpulo Ekuanot® Brand

Composición: Ácidos alfa 45-65 % p/p, ácidos beta 15-35 % p/p y % de aceites de destilación 5-15 % p/p.

- Mosto para cerveza

Estilo English IPA con miel, inoculado con levadura comercial S04 fermentis y adicionado con MgSO₄.

IV.2 Métodos

IV.2.1 Procedimientos generales

IV.2.1.1 Activación y lavado de cepas de BAL productoras de AB.

Las cepas (Tabla 5) que se encuentran conservadas a -20°C en caldo MRS adicionado de glicerol (20%) se reactivaron individualmente mediante 2 cultivos sucesivos de 30 µL en 3 mL de caldo MRS a 30°C durante 24-48 h. El último cultivo se centrifugó a 12 000 RPM / 2 min y se resuspendió en SSI para emplearse en las evaluaciones que se describen a continuación.

IV.2.1.2 Recuento en placa de células viables

Se hicieron las diluciones decimales necesarias a partir de las suspensiones iniciales de bacterias y se inocularon 100 o 333 µL en agar MRS (dependiendo de la concentración esperada), seguido de una extensión en agar MRS con perlas de vidrio estériles. Las placas inoculadas se incubaron a 30°C / 24-48 h.

IV.2.1.3 Recuento de bacteriófagos por el método agar en doble capa.

Se empleó la técnica de agar en doble capa de Kropinski et al. (2009) con algunas adaptaciones. Se inocularon 100 µL de cepa bacteriana (~ 9 log UFC / mL) y 100 µL del filtrado de bacteriófago o su dilución en buffer SM en 3 mL de agar suave MRS (0.6 % agar, 10 mM CaCl₂) se homogenizó usando vórtex y se vertió sobre una placa con agar MRS de manera uniforme. Las placas se incubaron a 30 °C / 24 h.

Después de la incubación se calculó el título de cada bacteriófago (Log UFP/mL) mediante el número de placas de lisis formadas y el factor de dilución correspondiente.

IV.2.2 Optimización de la técnica de aislamiento, enriquecimiento y conservación de bacteriófagos

Se evaluó el efecto del número de cultivos requeridos para propagar a los bacteriófagos hasta alcanzar concentraciones superiores a los 8 Log UFP/ mL. Para ello se propagaron las partículas del bacteriófago 8M2 en su cepa susceptible *Leuconostoc citreum* (5) a concentración de ~9 Log UFC/ mL, realizando 4 cultivos consecutivos, los tres primeros en 5 mL y uno en 10 mL de caldo MRS (120 %, 10 mM CaCl₂).

En el primer cultivo se inocularon 100 µL (1 Log UFC/mL) de placas de bacteriófagos resguardadas en Buffer SM con 100 µL de la cepa bacteriana. Para el segundo cultivo se tomó 1 mL del sobrenadante del cultivo 1 y se inoculó con 100 µL de cepa bacteriana fresca. Para el tercer cultivo se tomó 1 mL del sobrenadante del segundo cultivo y se procedió de la misma manera. Para el cuarto cultivo, se tomó 1 mL del sobrenadante obtenido a partir del tercer cultivo y se inoculó en 10 mL de caldo con 400 µL de cepa bacteriana fresca. Entre cada cultivo se incubó a 30 °C / 24 h, se centrifugó a 5 000 RPM / 5 min a 4 °C y se separó el sobrenadante para la reinoculación y cuantificación de los bacteriófagos (Log UFP/mL) mediante la técnica de agar en doble capa (**IV.2.1.3**).

El último sobrenadante obtenido se filtró con una membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm y se fraccionó en 2 partes iguales en tubos estériles, para evaluar el efecto del agar bacteriológico en la conservación de los bacteriófagos. A una de las alícuotas se le adicionó agar bacteriológico (0.05% p/v) y el tubo restante se empleó como control. Ambas suspensiones se almacenaron a 4°C durante 1 mes cuantificando las partículas virales (**IV.2.1.3**) cada semana.

IV.2.3 Obtención de bacteriófagos

IV.2.3.1 Recolección de muestras

Se recolectaron 45 muestras (30 en cervecerías artesanales y 15 en la Universidad Autónoma de Querétaro) de superficies de equipos, accesorios y pisos, contenido de alcantarillas, estanques, fuentes de agua, alimentos y residuos. Para las muestras de superficies se emplearon esponjas que se frotaron en un patrón de zig-zag dos veces en al menos 100 cm² de la superficie y se depositaron en 50 mL de Buffer SM en una bolsa estéril. Para las muestras líquidas como contenido de alcantarillas, estanques, fuentes de agua, alimentos y residuos se recolectaron ~50 mL del líquido en tubos falcon de 50 mL estériles.

IV.2.3.2 Aislamiento y purificación de bacteriófagos

Las muestras se centrifugaron a 5 000 RPM / 10 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró con una membrana de acetato de celulosa 0.45 µm y se resguardó en un tubo estéril a 4 °C. De los filtrados de cada muestra, se inoculó 1 mL en 10 mL de caldo MRS (120 %, 10 mM CaCl₂) con 400 µL de mezcla de bacterias por separado (Tabla 6) y se incubó a 30 °C / 24 h. Después de la incubación, la mezcla se centrifugó a 5 000 RPM / 5 min a 4 °C y se recuperó nuevamente el sobrenadante en un tubo estéril; este último se filtró y se empleó para la detección y cuantificación de bacteriófagos (IV.2.1.3). Una vez identificadas las muestras con presencia de bacteriófagos, se propagó con cada cepa bacteriana que constituía la mezcla utilizada para identificar la cepa hospedera.

Tabla 6. Composición de las mezclas de cepas para el aislamiento de bacteriófagos.

| Código de mezcla | Código de las cepas | Género y especie |
|------------------|---------------------|----------------------------------|
| M1 | C4, C7, C9 y C11 | <i>Levilactobacillus brevis</i> |
| M2 | 5 | <i>Leuconostoc citreum</i> |
| | C13 | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| M3 | C14, C18, C19 y C20 | <i>Levilactobacillus brevis</i> |

| | | |
|----|------------|-------------------------------------|
| M4 | 9 | <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> |
| | ATCC 33222 | <i>Ligilactobacillus saerimneri</i> |

De las placas de lisis con las cepas bacterianas individuales, se recuperaron ~10 placas con un mondadientes de madera estéril y se colocaron en 1 mL de Buffer SM en un tubo eppendorf y se almacenaron a 4°C. Para la purificación y concentración de los bacteriófagos, se emplearon dos cultivos sucesivos en 10 mL de caldo MRS (120%, 10 mM CaCl₂). Para el primero se tomó 400 uL de cepa bacteriana con 100 uL de las placas de lisis en Buffer SM. El segundo subcultivo se propagó a partir del primero, tomando 1 mL del filtrado del primer subcultivo e inoculándolo con 400 uL de cepa bacteriana fresca, cada cultivo se incubó a 30°C / 24 h. Ambos subcultivos fueron centrifugados y filtrados bajo las condiciones ya enunciadas. Los filtrados enriquecidos se emplearon para los ensayos posteriores.

IV.2.4 Identificación de bacteriófagos por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Una suspensión de 50 mL de cada bacteriófago purificado, se ultracentrifugó a 40 000 x g / 120 min a 4°C, en seguida se retiró el sobrenadante y este se resuspendió y homogenizó en 50 µL de PBS y 50 µL de glutaraldehído (2.5%). Después de ultracentrifugación los fagos 8M2, M2M, 44M2 y 44M3 se fijaron con glutaraldehído al 1.5% en cacodilato de sodio durante 1 hora a temperatura ambiente. En seguida, se colocaron 10 µL en la superficie de las rejillas de cobre recubiertas de formvar y se tiñeron con acetato de uranilo al 2.5%. Las rejillas secas se recubrieron con carbono y luego se examinaron en microscopio electrónico de transmisión (JEM 1400, JEOL LTD, Japón).

Con base en los criterios establecidos por Ackermann, (2001) se determinó el morfotipo e identificó la familia viral del fago. A partir de las micrografías se seleccionaron 6 fagos de cada uno y se midió la longitud de la cola y el diámetro de la cabeza en nm.

IV.2.5 Evaluación del efecto antimicrobiano de los bacteriófagos sobre BAL productoras de AB.

IV.2.5.1 Determinación del rango de hospederos

Para evaluar el rango de hospederos de cada bacteriófago con la colección de bacterias, se empleó la prueba de puntos de Kutter, (2009) con algunas modificaciones. Se inocularon 100 μL de cada una de las cepas bacterianas de manera individual en 3 mL de agar suave MRS (0.6 % agar, 10 mM CaCl_2) se homogenizó mediante vórtex y se vertió homogéneamente sobre una capa de agar MRS (1.55 % agar, 10 mM CaCl_2) y se dejó secar por 15 min. En seguida, en diferentes puntos sobre el agar se colocaron 10 μL de la suspensión de cada bacteriófago aislado y enriquecido a concentraciones entre 8 y 9 log UFP/mL, se dejó secar durante 20 min y se incubó a 30 °C/ 24 h. La lisis de los bacteriófagos fue clasificada como se muestra en la Figura 5.

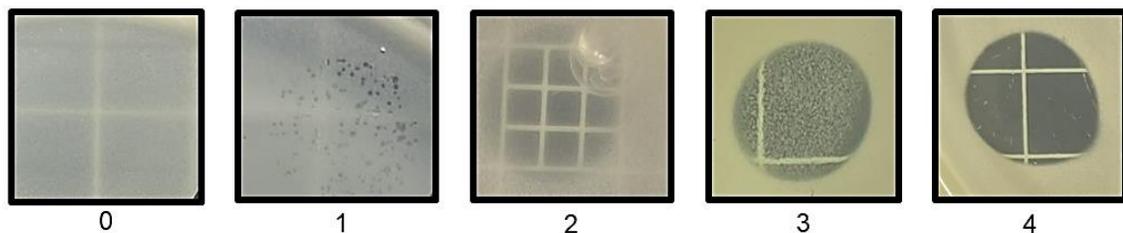


Figura 5. Clasificación de las placas o zonas de lisis.

En donde 0 sin lisis, 1 placas de lisis individuales, 2 turbidez en toda la zona de lisis, 3 lisis completa pero ligeramente turbia y 4 lisis completa.

A este ensayo se incorporó el bacteriófago ME2 (Figura 6) aislado por López-Gazucho et al. (2023). Los fagos que presentaron mayor calidad de lisis sobre las cepas C7 y C18 de *L. brevis* fueron seleccionados para los experimentos posteriores.

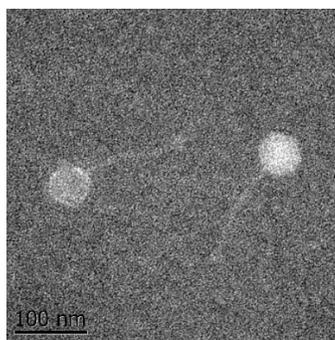


Figura 6. Micrografía electrónica del fago ME2 que infecta a la cepa 5 de *Leuconostoc citreum*. Escala 100 nm.

IV.2.5.2 Cinética de inhibición de desarrollo bacteriano

Se evaluó el efecto en medio líquido de los bacteriófagos más eficientes con su respectiva cepa bacteriana susceptible. Para ello, se inoculó 1 mL de bacterias previamente diluidas hasta alcanzar concentraciones de ~ 6 log UFC/mL y 1 mL de bacteriófagos en la mayor concentración alcanzada, en 8 mL de Caldo MRS (120%, 10 mM CaCl_2) y se llevó a incubar a 30 °C/ 24 horas. Se tomaron alícuotas de 1 mL a las 0, 3, 6, 12 y 24 horas y se cuantificó la población viable de las bacterias por cultivo en agar MRS (IV.2.1.2). Los controles para el ensayo consistieron en suspensiones de cada bacteria sin el bacteriófago. Con los resultados de esta sección se pudo evaluar la capacidad antimicrobiana de los fagos sobre las cepas de BAL, los cuales se emplearon en los experimentos posteriores.

IV.2.6 Evaluación del efecto de pH, contenido de alcohol y concentración del lúpulo sobre la capacidad de inhibición de los bacteriófagos en contra de las BAL productoras de AB

Se evaluó la actividad inhibitoria de los bacteriófagos en las diferentes condiciones relacionadas con el proceso de fermentación del mosto y de la cerveza mediante un diseño factorial fraccionado (2^{3-1}) (Tabla 3). Se incluyeron los factores pH (5 y 6), contenido de alcohol (4 y 8 %) y concentración de lúpulo (20 – 80 IBUS). Para ello, se ajustó el caldo MRS a las diferentes combinaciones de los factores usando una

solución concentrada de lúpulo de YCH Extracto de lúpulo Ekuanot® Brand a 2000 IBUS, etanol 98% y ácido láctico 88%.

Tabla 7. Formulación de cada tratamiento basado en el diseño factorial fraccionado.

| Tratamiento | pH | Etanol (%) | Lúpulo (IBUS) |
|-------------|----|------------|---------------|
| 1 | 5 | 4 | 20 |
| 2 | 6 | 4 | 80 |
| 3 | 5 | 8 | 80 |
| 4 | 6 | 8 | 20 |

Para corroborar que el caldo MRS se ajustó a los niveles establecidos de extracto de lúpulo se empleó la técnica de espectrofotometría UV/VIS a 275 nm (American Society of Brewing Chemists, 2023), la cual brevemente consistió en agitar mecánicamente 10 mL de muestra con un solvente orgánico no polar (2,2,4-trimetilpentano o iso-octano) y un ácido fuerte (HCl 6 N) lo cual permitió extraer los compuestos amargos del lúpulo en la capa del solvente no polar después de centrifugar. En el sobrenadante se midió la densidad óptica a 275 nm en espectrofotómetro. Las lecturas de densidad óptica obtenidas se multiplicaron por 50 (coeficiente de relación entre la pendiente de la correlación y la relación del iso-octano) para el cálculo de las unidades de amargor (IBUS).

El caldo MRS ajustado a cada tratamiento (8 mL) se inoculó con 1 mL de la suspensión de la cepa de BAL activada ~6 Log UFC/mL y con 1 mL de la suspensión de bacteriófagos ~1 a 2 Log UFP/mL (de acuerdo con la proporción bacteria/bacteriófago en la que se mostró inhibición **IV.2.5.2**) y se incubó a 25 °C/ 24 h. Se realizó recuento de células viables a las 0, 12 y 24 h; las diluciones requeridas se hicieron en caldo neutralizante. Como controles se emplearon la cepa de BAL sin bacteriófago en los mismos tratamientos y la cepa BAL sin bacteriófago en el caldo MRS sin inhibidores.

La cepa que mostró mayor capacidad para soportar las condiciones estresantes del medio se seleccionó junto con su bacteriófago, para proseguir con la siguiente etapa experimental.

IV.2.7 Evaluación del efecto antimicrobiano de bacteriófagos seleccionados sobre cepas de BAL y su producción de AB durante la fermentación de mosto de cerveza

Se empleó la metodología empleada por Poveda et al. (2017) y se adaptó para los fines experimentales. Para la evaluación del efecto antimicrobiano del fago sobre la BAL, se inoculó la cepa susceptible (~5 Log UFC/mL) con el fago (~1 Log UFP/mL) en 120 mL de mosto para cerveza ya inoculado con la levadura comercial. Como controles se tuvieron el mosto sin inóculo de bacteria y fago y el mosto con bacteria y sin fago.

Para la fermentación, el tratamiento y los controles se incubaron a 18°C por 13 días, con monitoreo diario de la densidad. Al final de la fermentación se midió el pH, la acidez y la concentración de etanol. El recuento de células viables se llevó a cabo a la mitad y al final de la fermentación en agar MRS (1.55 % agar, 0.01% cicloheximida) (**IV.2.1.2**) para todos los tratamientos.

La cuantificación de AB se realizó en el Laboratorio de Química, del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica. Se tomaron 10 ml de cada uno de los mostos fermentados a la mitad (día 3) y al final (día 13) de la etapa de fermentación, se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Las muestras descongeladas se pretrataron con orto-ftalaldehído (OPA), el cual se preparó de acuerdo con indicaciones de Smela *et al.* (2003) Brevemente, se disolvió 27 mg de o-ftalaldehído en 0.5 ml de etanol (99%), se agregó 20 µL de 2-mercaptoetanol (pureza >98) y se aforó en matraz de volumen de 5 ml con tampón de borato al 0.4 M (pH 9.5 ajustado con NaOH 1M).

Se mezcló el sobrenadante con 1 ml de OPA y se dejó reaccionar durante 2 min, inmediatamente la mezcla se hizo pasar por una columna HLB OASIS® (acondicionada con metanol y agua). Posteriormente la muestra se inyectó en una columna cromatográfica Agilent Technologies XDB-C8 LC (150 x 4.6 mm, 5 µm, PN 993967-906) acoplada a fluorescencia (G1231A) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). En esta se detectaron los metabolitos de interés por medio de fluorescencia a 330 nm (longitud de onda de excitación) y 440 nm (longitud de onda de emisión). La identificación de aminas biogénicas se hizo mediante la comparación de sus tiempos de retención con los tiempos de los patrones y con los definidos por Smela *et al.* (2003). Se empleó acetato 100 mM como fase móvil y acetonitrilo para HPLC (Sigma Aldrich) a un caudal de 0.6 ml/ min como gradientes de elución.

IV.2.9 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y un contraste de medias mediante prueba Tukey para el efecto de los cultivos en la concentración de bacteriófagos, evaluación de factores (pH, porcentaje de alcohol y concentración de lúpulo) en el efecto de inhibición de los fagos, en las características químicas de la cerveza y la cinética de desarrollo al final de la fermentación. Se realizó la prueba Dunnett para valorar el efecto del agar bacteriológico en la conservación de bacteriófagos y la cinética de inhibición de desarrollo bacteriano.

Cada experimento se repitió por lo menos tres veces. Para el análisis estadístico se empleó el programa GraphPad Prism versión 10.1.0 (316).

V. RESULTADOS Y DISCUSION

V.1 Propagación y conservación de los bacteriófagos

Para determinar el número de subcultivos para la propagación de bacteriófagos 8M2, se realizó la evaluación de cuatro cultivos sucesivos. A partir del cultivo 4 se evaluó el efecto del agar bacteriológico en la conservación de los bacteriófagos almacenados a 4°C.

De los 4 subcultivos evaluados para la propagación, se tuvo un incremento de 7.04 ± 0.39 Log UFP/mL a partir del primer cultivo. En los cultivos 2 y 3 no se observaron diferencias estadísticas con respecto a las concentraciones obtenidas en el cultivo 1, mientras que en el cuarto se alcanzaron concentraciones de 9.32 ± 0.27 Log UFP/mL comparado con los 8.04 ± 0.39 , 8.46 ± 0.34 y 7.99 ± 0.17 Log UFP/mL del primer, segundo y tercer cultivo respectivamente (Figura 7).

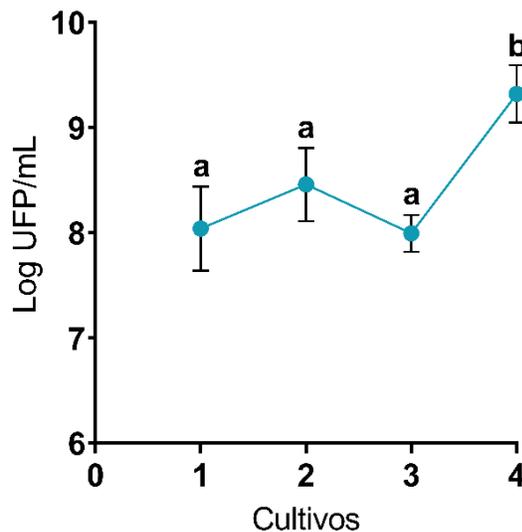


Figura 7. Efecto de los cultivos en la concentración de bacteriófagos.

Las letras diferentes representan diferencia estadística significativa con $p < 0.05$, $n=6$ (prueba Tukey).

La probabilidad de encuentro entre bacterias y fagos depende de la concentración de bacteriófagos presentes en el medio (título de fagos) así como de las concentraciones de la bacteria hospedera, aspecto importante en la propagación de

fagos (Abedon, 2023). Al aumentar las concentraciones de la bacteria hospedera se favoreció que los fagos individuales tuvieran a disposición una mayor cantidad de células a infectar y al haber más nutrientes en el medio las bacterias no infectadas pueden seguir desarrollando y aumentando su concentración y por ende los de fagos.

Autores como Nafarrate et al. (2020) obtuvieron un mayor porcentaje de recuperación de fagos al propagar con caldo Bolton selectivo para *Campylobacter*, favoreciendo el desarrollo de la bacteria e inhibiendo las bacterias nativas en piel de pollo, lo cual promovió la probabilidad de que los fagos inoculados encontraran a la célula huésped, la infectaran y así se replicaran, alcanzando concentraciones de 7.22 Log UFP/mL a partir de 6.69 Log UFP/mL de fagos inoculados.

Skaradzińska et al. (2020) evaluaron el método de cultivo en dos etapas con quince fagos diferentes, obteniendo diferentes aumentos en las concentraciones que oscilaron entre los 1.34 a ~7.69 Log UFP/mL en el segundo cultivo a partir de 4 Log UFP/mL inoculados. Los autores recomiendan el control de la densidad óptica (DO) del cultivo de fagos y bacterias para un reajuste de la proporción bacteria / fago y así aumentar las tasas de multiplicación.

Contar con una elevada concentración de bacteriófagos es importante, ya que facilita la evaluación *in vitro* y metodologías como TEM requieren de concentraciones > 8 Log UFP/mL para la observación de la morfología de los fagos (Ackermann, 2009). Además, cuanto mayor sea, se espera que la reducción de la bacteria huésped sea mayor y su aplicación en alimentos sea favorable (Lewis & Hill, 2020).

Con respecto a la conservación de bacteriófagos se observó que el agar bacteriológico mantuvo las concentraciones del fago 8M2 por encima de los 8 Log UFP/mL, con una reducción durante las 4 semanas de almacenamiento de 0.5 Log UFP/mL, mientras que el control sin la presencia del agar tuvo reducciones de hasta

2.03 ± 0.029 Log UFP/mL en la semana 4 con respecto a la concentración inicial (Figura 8).

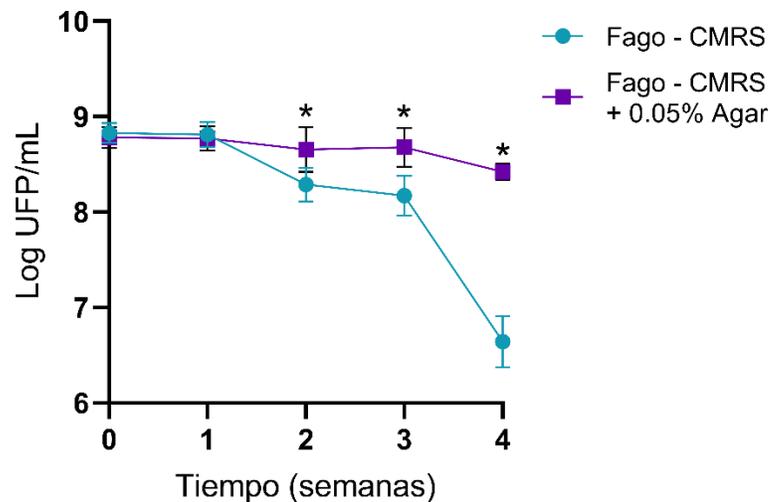


Figura 8. Efecto del agar bacteriológico en la conservación de bacteriófagos a 4°C.

Los asteriscos (*) representan diferencia estadística significativa con respecto al control sin agar en el mismo tiempo ($p < 0.05$, prueba Dunnett $n=6$)

La preservación aumentada de los fagos pudo deberse a la capacidad que tiene el agar para formar geles, los cuales atrapan a las partículas de fagos y los protegen del daño de factores externos, efecto similar al de la carragenina empleada en la microencapsulación de probióticos (Choińska-Pulit et al., 2015). Comúnmente los medios de cultivo líquidos con fagos son adicionados con sustancias proteicas como la gelatina, para favorecer la estabilidad de las partículas durante el almacenamiento (Tovkach et al., 2012).

Algunos otros métodos de conservación como la congelación y la liofilización emplean glicerol, dimetilsulfóxido (DSMO), disacáridos (sacarosa, lactosa y trehalosa), glutamato monosódico, péptidos, proteínas (caseína y lactoferrina) y PEG 6000 para aumentar la estabilidad y título de los fagos; no obstante, los métodos y condiciones de almacenamiento deben ajustarse con base a las propiedades y características de cada fago (Jończyk-Matysiak et al., 2019).

Por ejemplo, el fago VP3 que infecta a *Vibrio cholerae* mostró mayor estabilidad en medio de cultivo Luria Bertani adicionado con glicerol (30% p/v) cuando era almacenado a los 4 °C y -20 °C durante 20 semanas, mientras que a los -80 °C y -196 °C el efecto del glicerol sobre la estabilidad fue negativo comparado con el control sin crioprotector. A su vez el DMSO mostró menor estabilidad de los fagos comparado con el efecto del glicerol (Xiao et al., 2022). Por otro lado, la adición de sacarosa (0.1 mol/L) en bajas concentraciones a buffer SM mantuvo con mayor estabilidad a los fagos CA933P durante la congelación y liofilización (con reducciones de ~1 Log de UFP/mL a los 120 días), que cuando emplearon concentraciones altas de sacarosa (0.3 y 0.5 mol/L) (Dini & de Urza, 2013).

En general el uso de medio de cultivo líquido, mayor volumen de medio y mayor concentración de bacterias favoreció la propagación de los bacteriófagos alcanzando concentraciones > 9 Log UFP/mL y la adición de agar 0.05% mantiene el título de fagos con pequeñas disminuciones durante 4 semanas; la evaluación de la influencia de otros factores en la conservación de fagos permitiría obtener información para estandarizar métodos de conservación de fagos a largo plazo, tales como: temperatura de almacenamiento, crioprotectores, disacáridos y tipo de fago.

V.2 Aislamiento y purificación de bacteriófagos

Para el aislamiento de bacteriófagos se procesaron 45 muestras procedentes de superficies, agua, alimentos y residuos; estas muestras se enriquecieron con mezclas de las cepas de interés y mediante la técnica de agar en doble capa se realizó la detección y cuantificación de bacteriófagos. De las mezclas en donde se detectaron fagos, se propagó el fago con todas las cepas que conformaban la mezcla, pero de manera individual. Una vez identificada la cepa hospedera para cada uno se purificó mediante dos cultivos sucesivos en medio líquido para obtener concentraciones altas para los estudios posteriores.

De las muestras analizadas, se recuperaron 4 bacteriófagos procedentes de 3 muestras, concretamente el bacteriófago 8M2 se aisló de agua procedente de una alcantarilla en una cervecera artesanal, el bacteriófago M2M se aisló de un estanque de agua y los bacteriófagos 44M2 y 44M3 a partir de residuo lácteo recuperado de una planta de lácteos (Tabla 8).

Tabla 8. Bacteriófagos aislados a partir de las muestras de superficies, agua, alimentos y residuos recolectados, para cada mezcla de bacterias evaluadas.

| Tipo de muestra | Número de muestras positivas/ analizadas | Número de fagos aislados por mezclas de bacterias | | | | Fagos aislados | Concentración de fagos (Log UFP/mL) |
|----------------------|--|---|----|----|----|----------------|-------------------------------------|
| | | M1 | M2 | M3 | M4 | | |
| Superficies | 0/24 | - | - | - | - | - | - |
| Agua | 2/17 | - | 2 | - | - | 8M2 | 2.04 |
| | | | | | | M2M | 2.88 |
| Alimentos y residuos | ¼ | - | 1 | 1 | | 44M2 | 1.77 |
| | | | | | | 44M3 | 2.23 |

M1 (*L. brevis* C4, C7, C9 y C11), **M2** (*Lc. mesenteroides* C13 y *Lc. citreum* 5), **M3** (*L. brevis* C14, C18, C19 y C20) y **M4** (*L. plantarum* 9 y *L. saerimneri* ATCC 33222)

Las aguas residuales son una fuente importante de bacteriófagos al contener material orgánico e inorgánico que permite la proliferación de una gran diversidad de bacterias (Alharbi & Ziadi, 2021). Kelly et al. (2012) aislaron al fago cIP1 a partir de una muestra de agua residual para el biocontrol de *Pediococcus damnosus*, una bacteria deterioradora de cerveza, mientras que Feyereisen et al. (2019) aislaron 5 bacteriófagos que infectan a *Levilactobacillus brevis* a partir de 2 muestras de agua residual de un total de 200 muestras evaluadas (ensilaje, agua residual y productos fermentados).

Así mismo, en la industria de productos lácteos, es común encontrar bacteriófagos que infectan a las BAL, debido a su amplio uso como cultivos iniciadores (O'Sullivan et al., 2019) en donde el manejo constante de las mismas cepas favorece la infección por fagos y la rápida multiplicación provoca aumentos en su concentración (Briggiler Marcó & Mercanti, 2021). Capra et al. (2009) aislaron 22 fagos que infectan a *Lactocaseibacillus paracasei* a partir de 73 muestras (ambiente, producto

y superficies) tomadas en una planta de productos lácteos probióticos. Wagner et al. (2017) aislaron 55 fagos que infectan a *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lc. mesenteroides* y *Lc. pseudomesenteroides* a partir de 23 muestras de suero en polvo. Lo que indica que la industria de lácteos y sus productos son una fuente excelente de aislamiento de bacteriófagos que infectan a las BAL.

Los bacteriófagos pueden encontrarse en cualquier fuente en donde su bacteria hospedera exista, además estos pueden ingresar de múltiples formas: a través de una fuente externa como el movimiento (aire, superficies, materias primas, ingredientes reciclados), mediante la inducción de un fago lisogénico presente en alguna bacteria (cultivos iniciadores); o bien, los fagos presentes mutan ampliando su rango de hospederos, de tal modo que una determinada población de bacterias que antes no era susceptible al fago se vuelve susceptible (Garneau & Moineau, 2011).

Las concentraciones en las que se aislaron los fagos a partir de las mezclas fueron de 2.04, 2.88, 1.77 y 2.23 Log UFP/mL para 8M2, M2M, 44M2 y 44M3, respectivamente (Tabla 8). Se determinaron las cepas hospederas para cada bacteriófago en donde los fagos 8M2 y M2M infectaron a *Lc. citreum* (5), 44M2 a *Lc. mesenteroides* (C13) y 44M3 a *L. brevis* (C18) (Figura 9) y en lo que concierne a las concentraciones alcanzadas con su cepa hospedera después de 2 cultivos sucesivos, se obtuvo 9.32, 8.95, 2.17 y 3.84 Log UFP/mL, respectivamente.

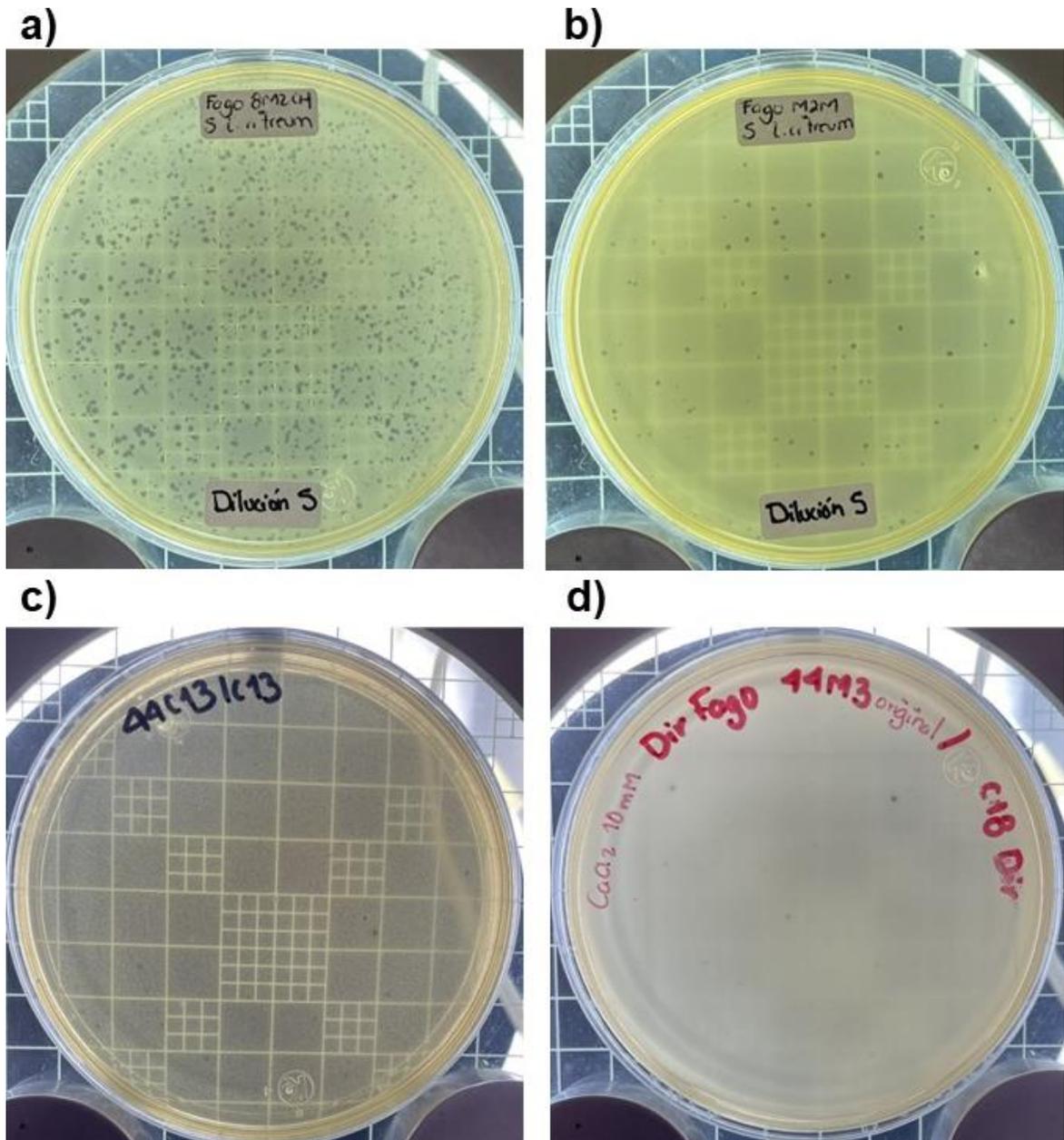


Figura 9. Morfología de las placas de los bacteriófagos después de propagación con cepa su susceptible a) 8M2, b) M2M, c) 44M2 y d) 44M3.

La baja concentración de los fagos 44M2 y 44M3 podría deberse a diferentes factores, entre los que pudieran encontrarse las endolisinas, las cuales son enzimas codificadas por los fagos al final de su multiplicación y participan en la degradación enzimática de los hospederos (Nachimuthu et al., 2021). Estas enzimas que

degradan el peptidoglicano en las bacterias Gram positivas y provocan su lisis también pueden afectar a las células bacterianas cercanas no infectadas reduciendo sus poblaciones sin la generación de viriones (Wohlfarth et al., 2023).

El quorum sensing (QS) también podría estar implicado en la activación de mecanismos de resistencia antifagos de las bacterias para evadir su ataque (León-Félix & Villicaña, 2021). Por ejemplo, la producción de vesículas de membrana con receptores como señuelo para fagos y reducir su absorción (Reyes-Robles et al., 2018), síntesis de exopolisacáridos para bloquear los sitios receptores, modificación de sitios receptores, producción de proteínas que enmascaran sitios receptores y sistemas CRISPR-Cas que proporcionan inmunidad adaptativa contra ADN extraño. Todo lo anterior finalmente impacta en los ciclos de infección y en las poblaciones de fagos (Labrie et al., 2010; Philippe et al., 2023).

Retomando el trabajo de Skaradzińska et al. (2020) quienes evaluaron 5 métodos de propagación con 15 diferentes fagos, concluyeron que es difícil estandarizar un método de propagación universal para fagos y que debe hacerse de manera individual considerando factores como: condiciones físicas y químicas (temperatura, pH, cofactores de adsorción, aireación, entre otros), sistema fago-huésped, la multiplicidad de infección (MOI), morfología y tamaño de virión, accesibilidad a los receptores bacterianos, tiempos de incubación y volumen del medio de cultivo.

V.3 Identificación de bacteriófagos mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Los bacteriófagos aislados y purificados se ultra centrifugaron, se tiñeron con acetato de uranilo al 2.5% y luego se observaron mediante TEM, se compararon las morfologías con las características de las diferentes familias de fagos reportadas en la literatura para la identificación, se midió la longitud de la cola y el diámetro de la cabeza de 6 seis fagos.

Los morfotipos encontrados para los cuatro bacteriófagos correspondieron al B1 (Ackermann, 2001), característico de la familia Siphoviridae. Esta familia se distingue principalmente por la cola larga no contráctil, específicamente para el morfotipo B1, las cápsides o cabezas son icosaédricas isoméricas (Figura 10). La longitud de la cola osciló entre los 137 ± 4.11 a 285.58 ± 7.12 nm y el diámetro de la cabeza entre 46.22 ± 1.24 a 70.98 ± 4.78 nm (Tabla 9).

Los fagos que se han aislado para BAL corresponden al orden de los Caudovirales y la mayoría de ellos pertenece a la familia Siphoviridae (Briggiler Marcó & Mercanti, 2021). Para *Leuconostoc* sp. se han aislado 76 fagos Siphoviridae morfotipo B2 y para *Lactobacillus* 60 fagos de la familia Myoviridae morfotipo A1 y 84 fagos Siphoviridae de los cuales 79 son de morfotipo B1, 1 de morfotipo B2 y 4 de morfotipo B3 (Ackermann, 2001). Además, el 61% de los fagos reportados en la literatura pertenecen a la familia Siphoviridae (Ackermann, 2007).

Tabla 9. Taxonomía y morfología de los fagos aislados.

| Bacteriófagos | 8M2 | M2M | 44M2 | 44M3 |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Familia | Siphoviridae | Siphoviridae | Siphoviridae | Siphoviridae |
| Morfotipo | B1 | B1 | B1 | B1 |
| Longitud de cola (nm \pm DE) | 137.28 ± 4.11 | 143.47 ± 3.41 | 285.58 ± 7.12 | 269.77 ± 5.11 |
| Diámetro de la cabeza (nm \pm DE) | 56.89 ± 1.73 | 46.22 ± 1.24 | 54.83 ± 2.73 | 70.98 ± 4.78 |

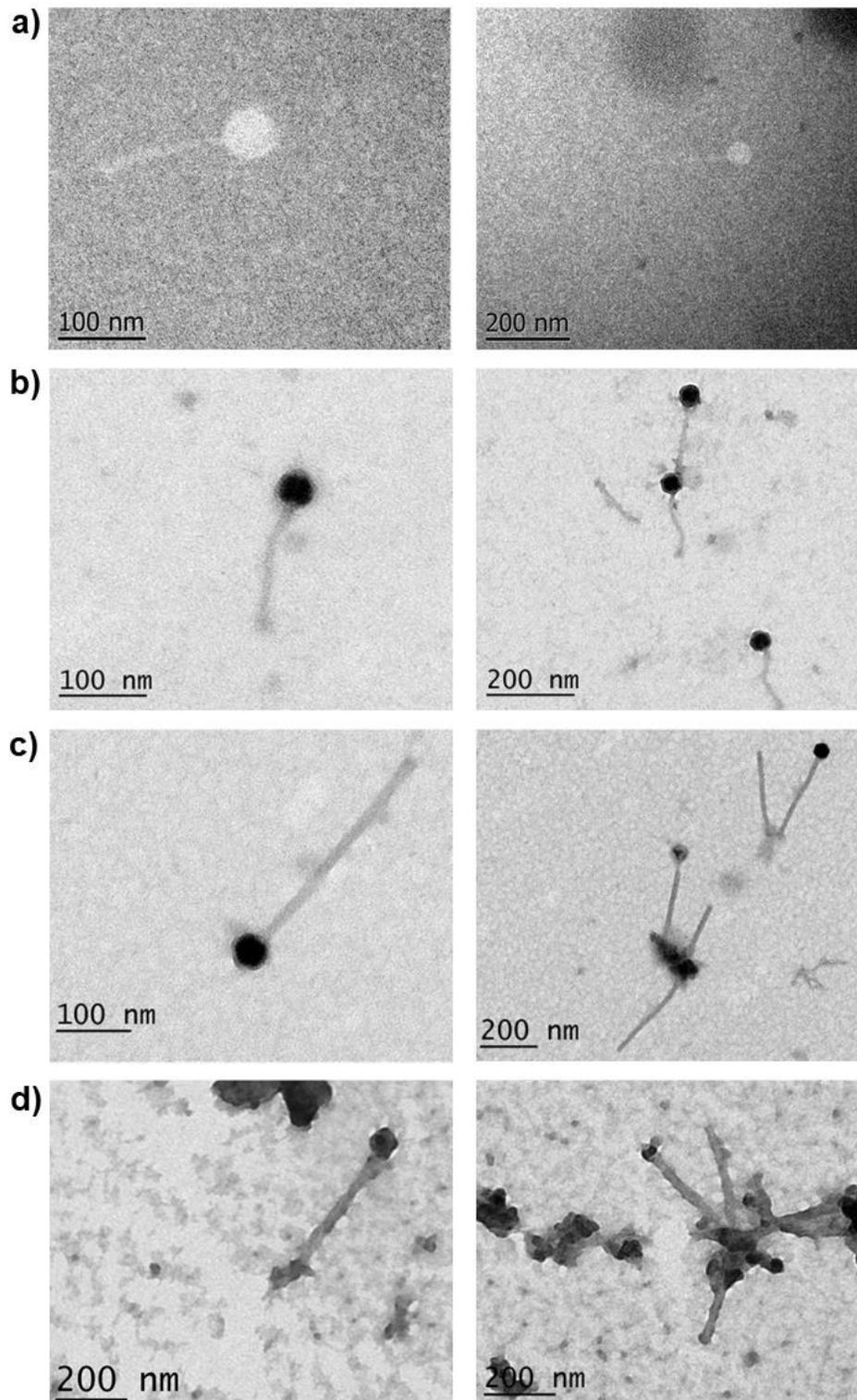


Figura 10. Micrografías obtenidas por TEM de los fagos a) 8M2, b) M2M, c) 44M2 y d) 44M3. Escala 100 y 200 nm.

V.4 Determinación del rango de hospederos

Para la evaluación del rango de hospederos, se empleó la prueba de puntos con base en lo establecido por Kutter (2009), en donde se retó cada cepa productora de AB a los 4 bacteriófagos aislados (después de enriquecimiento) y el fago ME2 con características de la familia Siphoviridae aislado por López-Gazucho et al. (2023). El rango de hospederos de cada fago se muestra en la Figura 11.

Conocer el rango de hospederos de un bacteriófago en particular permite identificar las bacterias en las que puede generar una infección productiva (Hyman & Abedon, 2010). Este rango puede ser reducido (altamente específico a nivel género y especie) o amplio (infectar múltiples bacterias de diferentes géneros y especies). Estos últimos se encuentran ampliamente distribuidos en ambientes naturales y la capacidad de infectar a múltiples hospederos está relacionado a mutaciones en el gen *RPB* (proteína de unión al receptor), así como en otros genes (de Jonge et al., 2019).

Mientras que, la susceptibilidad de las BAL a los fagos también está relacionada al intercambio de genes que codifican para glicosiltransferasas de diferentes loci de polisacáridos de la pared celular entre las bacterias, por lo que las bacterias que no eran susceptibles a la infección por determinados fagos lo son al expresar los genes que tomaron de otra bacteria que sí lo era (Ainsworth et al., 2014). No obstante, la tasa de mutación de los fagos es hasta 100 veces mayor que la de las bacterias (Sanjuán et al., 2010).

El contacto previo de los fagos con una gran diversidad de bacterias en un determinado medio pudo favorecer dichas mutaciones, por ejemplo, en ambientes de producción de cerveza artesanal se han aislado BAL como *Lc. mesenteroides*, *Lc. citreum*, *P. acidilacti*, *L. paracasei*, *L. parabuchneri* y *L. brevis* (Garofalo et al., 2015; Rodríguez-Saavedra et al., 2020). Por su parte, en la industria láctea se ha reportado la presencia de *Lactococcus lactis*, *Streptococcus termophilus*, *Leuconostoc*

sp., *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, entre otros (Briggiler Marcó & Mercanti, 2021).

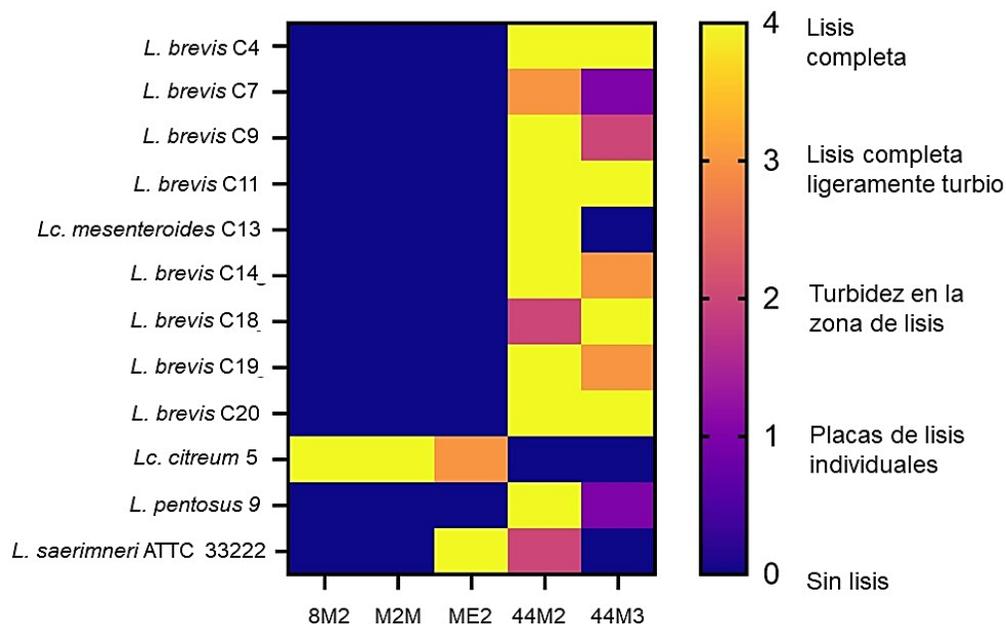


Figura 11. Rango de hospederos y calidad de lisis de los cinco bacteriófagos evaluados.

A pesar de que la mayoría de los reportes en donde se aislaron bacteriófagos que infectan BAL presentan un rango de hospederos limitado a nivel de género y especie (Romero et al., 2020), Legrand et al. (2016) demostraron que el fago Tuc2009 que infecta a *Lactococcus lactis*, posee dos sitios de reconocimiento de carbohidratos en la placa base. Por su parte Lu et al. (2003) aislaron 3 fagos que infectaban entre 5 y 6 cepas de bacterias diferentes entre las que se incluían *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. paraplantarum* y *L. pentosus*, lo cual indica que los bacteriófagos no siempre son específicos para un solo género y especie.

Los 4 fagos aislados tuvieron una calidad de lisis de 4 en sus cepas hospederas. Para el caso del fago 44M2 la calidad de lisis fue de 2 a 4 en las cepas evaluadas, excluyendo a *L. citreum* (5) en el cual no se observó lisis. Mientras que la calidad de lisis del fago 44M3 osciló entre 0 y 4, no se observó lisis en *Lc. citreum* (5), *Lc. mesenteroides* y *L. saerimneri* (ATCC 33222). Con base en la calidad de lisis, los

fagos que producen placas transparentes son clasificados como líticos o virulentos (Khan Mirzaei & Nilsson, 2015), mientras que los fagos que producen placas turbias se consideran lisogénicos o temperados; aunque las placas turbias también pueden indicar resistencia de las bacterias a la infección por fagos (Abedon, 2018). Bajo estos criterios autores como Ávila et al. (2023) han seleccionado fagos con una calidad de lisis mayor a 3 y amplio rango de hospederos para su aplicación en procesos y productos alimentarios.

Los bacteriófagos con amplio rango de hospederos y con capacidad de lisis mayor a 3 sobre las cepas C7 y C18 de *L. brevis* se seleccionaron para los ensayos posteriores, ya que estas cepas tienen la capacidad de sobrevivir a condiciones adversas de la cerveza artesanal y producir altas concentraciones de AB (Ovalle-Marmolejo et al., 2023).

V.5 Cinética de inhibición de desarrollo bacteriano

El efecto de inhibición de los fagos seleccionados se evaluó en medio de cultivo líquido MRS inoculando la cepa bacteriana susceptible a concentración final de ~ 6 Log UFC/mL y el bacteriófago en su máxima concentración alcanzada (~ 1 Log UFP/mL para el fago 44M2, ~ 2 Log UFP/mL para el fago 44M3). Las poblaciones viables de bacterias se cuantificaron a las 0, 3, 6, 12 y 24 h por cultivo en agar MRS.

La reducción de las poblaciones microbianas para ambas cepas se observó desde las primeras 3 h de incubación. Para el caso de la cepa C7 de *L. brevis*, el bacteriófago 44M2 redujo 3.06 ± 0.37 , 4.53 ± 0.40 , 5.12 ± 0.27 y 4.08 ± 0.22 Log UFC/mL a las 3, 6, 12 y 24 h respectivamente. Mientras que el fago 44M3 mantuvo las poblaciones de la cepa C18 de *L. brevis* por debajo del límite de detección reduciendo $\geq 5.34 \pm 0.15$ Log UFC/mL a las 3 h y hasta 8.31 ± 0.15 Log UFC/mL a las 24 h (Figura 12).

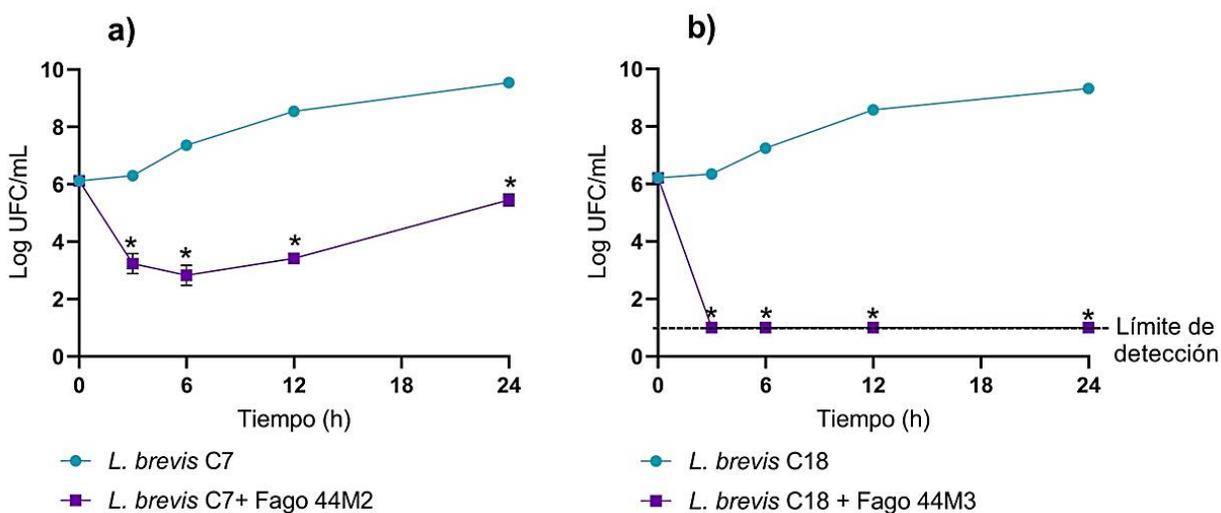


Figura 12. Cinética de inhibición de desarrollo bacteriano a) fago 44M2 sobre *L. brevis* (C7) y b) fago 44M3 sobre *L. brevis* (C18). Diferencias estadísticas significativas (*) con un $p < 0.05$, $n=3$ (prueba Dunnett).

No obstante la reducción inicial de ~5 Log UFC/mL, a las 12 h de contacto con el bacteriófago se observó incremento de 1 Log UFC/mL de *L. brevis* C7 en el cultivo con fagos (Figura 12, a). Este resultado refuerza la idea acerca de los mecanismos de resistencia que desarrollan las bacterias a la infección por estos. Greer et al. (2007) evaluaron la actividad inhibitoria del fago ggg contra *Lc. gelidum* (bacteria deterioradora de carne) en caldo APT durante 11 días de incubación, obteniendo como reducción máxima ~4 Log UFC/mL a los 4 días, sin embargo, a partir del día 4 al día 11 obtuvieron incrementos en las poblaciones bacterianas. Al final 28 de las 36 cepas de *L. gelidum* que evaluaron mostraron resistencia a los fagos en comparación con las que no tuvieron contacto con ellos. Mudgal et al. (2006) también observaron reducción en las poblaciones de *Lc. mesenteroides* de entre 1 - 2 Log UFC/mL aproximadamente entre las 3 y 5 h de incubación en Caldo MRS, empleando 2 y 3 Log UFP/mL del fago 1-A4, en donde las bacterias resistentes continuaron desarrollando en el medio después de las 5 h.

Las altas reducciones del fago 44M3 sobre *L. brevis* C18 (Figura 12, b), pudieran deberse a que el fago se adicionó a concentraciones más altas con respecto al fago

44M2 (~2 Log UFP/mL vs~1 Log UFP/mL). Hay que destacar que, para ambos fagos, las poblaciones de bacterias se mantuvieron por debajo de las concentraciones obtenidas en el control mostrando potencial para su aplicación en alimentos.

V.6 Evaluación del efecto de pH, contenido de alcohol y concentración del lúpulo en el efecto de inhibición de los bacteriófagos sobre las BAL productoras de AB

La cerveza es una bebida que presenta condiciones desfavorables para las bacterias y no existen reportes del efecto de estas condiciones sobre los fagos. Por ello es fundamental valorar que los fagos ejerzan su efecto en condiciones de pH, contenido de alcohol y concentración de lúpulo similares a la cerveza.

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de los bacteriófagos sobre las cepas BAL productoras de AB, se diseñaron diferentes tratamientos (T1, T2, T3 y T4) incluyendo los 3 factores con dos niveles cada uno, evaluando sólo una fracción de ellos con base en un diseño factorial fraccionado (2^{3-1}). Las concentraciones empleadas de los bacteriófagos fueron de ~1 Log UFP/mL y ~6 Log UFC/mL para la cepa bacteriana. Como controles se tuvo a la cepa de BAL sin la presencia de bacteriófagos en los mismos tratamientos y la cepa BAL en caldo MRS sin inhibidores.

Las dos cepas de *L. brevis* C7 y C18 sin la presencia del fago presentaron comportamientos análogos entre sí en los tratamientos T1 (pH 5, etanol 4% y lúpulo 20 IBUS), T2 (pH 6, etanol 4% y lúpulo 80 IBUS) y T4 (pH 6, etanol 8% y lúpulo 20 IBUS). En estos tres tratamientos se cuenta con combinaciones en donde sólo uno de los factores se encuentra en el nivel más adverso. Se observó que las bacterias lograron sobrevivir en el medio, sin experimentar aumento en sus poblaciones durante las 24 h evaluadas (Figura 13 a y b). Algunas cepas de *L. brevis* tienen la capacidad de sobrevivir a las condiciones adversas de la cerveza y por tal motivo, algunas de ellas, están altamente relacionadas al deterioro (Suzuki, 2011). Estas

expresan una diversidad de genes involucrados en el transporte de membrana, estrés oxidativo, obtención de nutrientes y metabolismo de azúcares, síntesis de compuestos como ácidos grasos, descarboxilación de amino ácidos para sobrevivir en ambientes ácidos (Feyereisen et al., 2020).

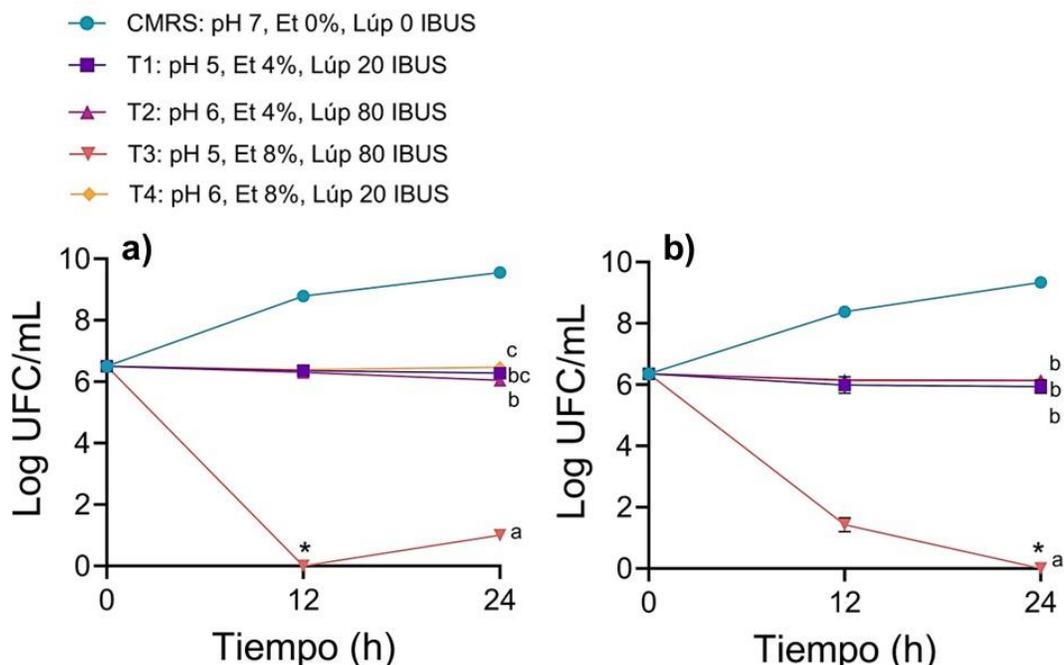


Figura 13. Comportamiento de *L. brevis* a) C7 y b) C18, (*)1 UFC/ mL. Las letras diferentes representan diferencia significativa con $p < 0.05$, $n=3$ (prueba Tukey).

En el tratamiento T3 (pH 5, etanol 8% y lúpulo 80 IBUS) las poblaciones bacterianas disminuyeron drásticamente a las 12 h. En este tratamiento se conjuntaron las condiciones más adversas de los tres factores evaluados. Específicamente la cepa C7 experimentó una reducción de hasta 6.50 ± 0.06 Log UFC/mL a las 12 h, seguida de un aumento de 1 Log UFC/mL a las 24 h. En el caso de la cepa C18 se observó una disminución de 4.92 ± 0.17 Log UFC/mL a las 12 h y a las 24 h se obtuvieron concentraciones menores al límite de detección de 1 UFC/mL (Figura 13 a y b).

Haakensen et al. (2009) observaron que la adición de etanol al 5 % v/v a placas de agar con lúpulo (9 IBUS), limita de manera más efectiva el desarrollo de algunas cepas de BAL deterioradoras de cerveza en comparación con el uso exclusivo de

placas con solo lúpulo, mientras que en otras cepas la adición de etanol favoreció el desarrollo después de un tiempo. Zhao et al. (2017) encontraron que el pH bajo (4.3) potencia el efecto de los compuestos antimicrobianos del lúpulo logrando mayores reducciones en las poblaciones microbianas, no obstante, también observaron que con la adición de etanol al 4.6 % v/v se ve favorecido el desarrollo de dos cepas de *L. brevis* resistentes al lúpulo.

En el análisis de efectos principales, se observó que para la cepa C7 el lúpulo tuvo mayor influencia en su desarrollo y se sabe que los iso- α -ácidos del lúpulo causan daño a las membranas de las bacterias debido a su actividad ionófora (Schurr et al., 2015). Mientras que para la cepa C18 fue el pH. En cuanto al etanol se sabe que este aumenta la permeabilidad de la membrana favoreciendo el ingreso, en este caso, de los compuestos del lúpulo (Barker & Park, 2001). No obstante, los tres factores afectan el desarrollo de ambas cepas (Figura 14 a y b) y no se puede atribuir la reducción a un factor específico debido a que los efectos principales están confundidos con las dobles y triples interacciones entre factores.

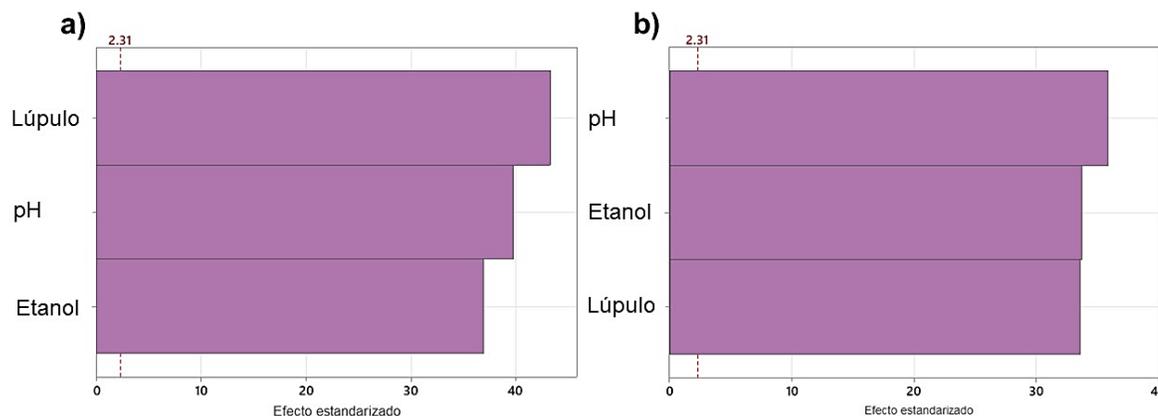


Figura 14. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para a) C7 y b) C18, $p < 0.05$, $n=3$.

Para el caso del control en caldo MRS las poblaciones bacterianas desarrollaron de manera óptima alcanzando concentraciones de 9.55 ± 0.07 y 9.34 ± 0.05 Log UFC/mL a las 24 h para C7 y C18 respectivamente (Figura 13 a y b).

Los tratamientos evaluados por sí solos afectan el desarrollo de las cepas de *L. brevis* C7 y C18 manteniendo las poblaciones o reduciéndolas de manera drástica. Lo que confirma el hecho de que la cerveza es poco favorable para la actividad microbiana y nos muestra la capacidad de las BAL para sobrevivir en condiciones adversas.

En cuanto a la eficacia de los fagos en cada tratamiento y el control con su respectiva cepa hospedera, se observaron variaciones en las reducciones de las poblaciones bacterianas. La mayor disminución se registró en el tratamiento T2 para ambas cepas. Para la cepa C7, el fago 44M2 logró reducir las poblaciones 4.14 ± 0.32 y 4.47 ± 0.16 Log UFC/mL a las 12 y 24 horas, respectivamente. El fago 44M3 también disminuyó las poblaciones 3.34 ± 0.17 y 3.59 ± 0.22 Log UFC/mL a las 12 y 24 h (Figura 15 a y b). Lo anterior podría deberse a las altas concentraciones del lúpulo (80 IBUS) presentes en este tratamiento, los iso- α -ácidos del lúpulo al entrar a la célula se disocian en aniones y protones, se unen a Mn^{2+} (cationes divalentes) y son transportados a través de la membrana plasmática, lo que provoca la disminución del pH intracelular, la disipación del gradiente de protones transmembranal y la fuerza motriz de protones, lo que finalmente reduce la absorción de nutrientes haciéndolas más vulnerables al ataque de los fagos (Erzinger et al., 2021).

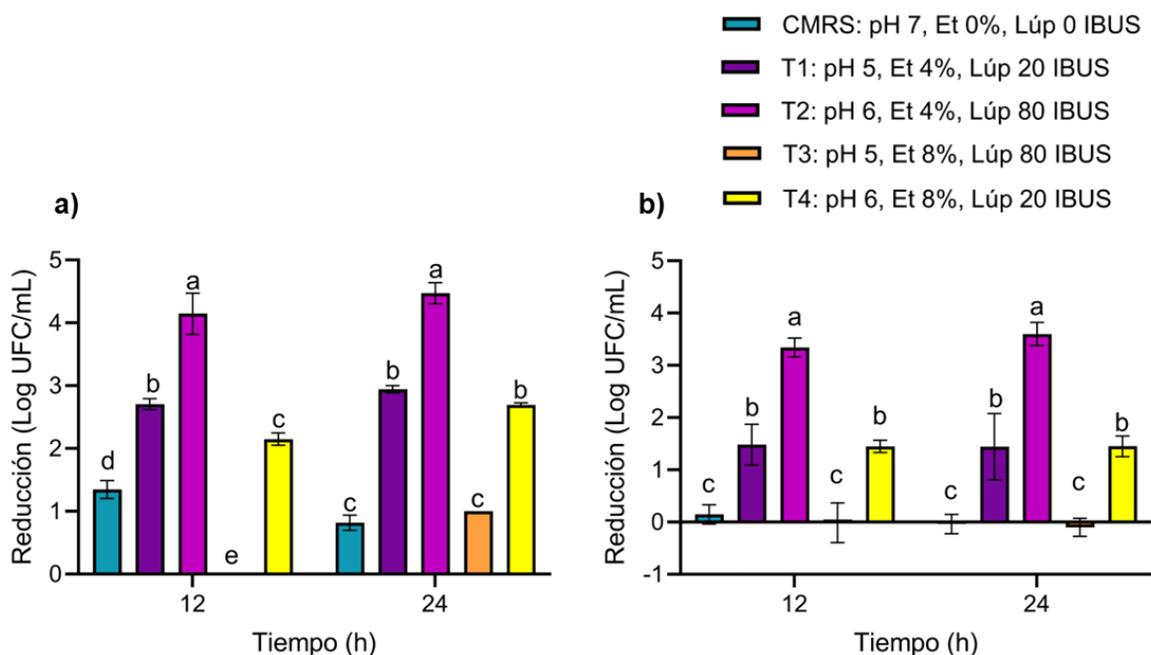


Figura 15. Reducción de las poblaciones de *L. brevis* a) C7 por el fago 44M2 y b) C18 por el fago 44M3 en los tratamientos y el control a las 12 y 24 h. Las letras diferentes representan diferencia significativa con $p < 0.05$, $n=3$ (prueba Tukey).

En los tratamientos T1 y T4 las reducciones logradas tuvieron bastante similitud en cada cepa con su fago correspondiente. En la cepa C7, el fago 44M2 logró reducciones de 2.94 ± 0.05 y 2.69 ± 0.03 Log UFC/mL en los tratamientos T1 y T4, respectivamente. Por su parte el fago 44M3 logró reducir 1.44 ± 0.63 y 1.45 ± 0.19 Log UFC/mL de la cepa C18 en los tratamientos T1 y T4, a las 24 h (Figura 14 a y b).

En el tratamiento T3 no se observaron efectos contundentes en la reducción de las poblaciones para la cepa bacteriana C7 por parte del fago 44M2, debido a la baja concentración de células que lograron sobrevivir desde las 12 h (Figura 13) causada por el medio adverso. Mientras que para la cepa C18 el fago 44M3 no logró reducir las poblaciones restantes a las 12 h de incubación, que también se encontraban en niveles muy bajos (~ 1 Log UFC/mL).

Silva & Sauvageau, (2014) obtuvieron diferencias en la infectividad de los fagos B1 y B2 sobre *Lactiplantibacillus plantarum* cuando los evaluaron en 6 diferentes valores de pH en medio de cultivo M9 a 30 °C; estos fagos mostraron mayor infectividad entre pH de 5 y 6. Costantini et al. (2017) encontraron que el pH inferior a 3.23 y la presencia de etanol 10% v/v (condiciones cercanas al vino) afectan la actividad lítica de los fagos que infectan a *O. oeni* en caldo MRS modificado, mostrando resistencia de la bacteria a los fagos probados. Se ha comprobado que las células que se han cultivado a pH 3.5 y etanol 8% v/v presentan cambios en la composición de lípidos de la membrana aumentando la rigidez y modificando la superficie celular bacteriana, lo que finalmente limita que el fago encuentre los sitios receptores (Grandvalet et al., 2008). Por lo que Watanabe & Takesue, (1972) recomiendan que el pH del medio se encuentre entre 5.5 y 6 para que la infección de los fagos contra *Lactocaseibacillus casei* sea efectiva. La capacidad infecciosa del fago 8014-B2 contra *L. plantarum* no se ve afectada por la presencia de etanol durante la fermentación alcohólica para la producción de biocombustible. Sin embargo, se observa una disminución en el potencial de infección, lo que sugiere que, aunque el etanol por sí solo no tiene impacto, la presencia de otros factores contribuye a este fenómeno (Worley-Morse et al., 2015).

En general, se observó que los factores (pH, etanol y lúpulo) en los niveles evaluados potenciaron la actividad inhibitoria de ambos fagos. Esto no es sorpresa ya que la sinergia entre diferentes antimicrobianos favorece la reducción de las poblaciones bacterianas; tal es el caso de la nisina y el uso del listeriófago LH7, los cuales en uso combinado en caldo soya tripticaseína lograron reducir significativamente las poblaciones de *Listeria monocytogenes* (hasta ~2 Log UFC/mL a las 24 h) sin regeneración, comparado con el uso individual de cada antimicrobiano para su aplicación en carne cruda (Dykes & Moorhead, 2002). De la misma forma, el uso conjunto de la bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* y el bacteriófago SAP84 inhibió significativamente el desarrollo de *Staphylococcus*

aureus en caldo MRS inhibiendo 2.8 Log UFC/mL a las 6 h de incubación (S. G. Kim et al., 2019).

En el control caldo MRS sin inhibidores las reducciones observadas fueron menores que en los tratamientos T1, T2 y T4. A las 24 h la reducción lograda en el control para ambas cepas fue menor en comparación con las de 12 h contrario a lo ocurrido en los tratamientos. Para la cepa C7 el fago 44M2 redujo 1.34 ± 0.14 y 0.81 ± 0.12 Log UFC/mL a las 12 y 24 h. El fago 44M3 redujo 0.14 ± 0.18 a las 12 h y a las 24 h no se observó reducción en las poblaciones bacterianas. Esto pudo deberse a que en comparación con los tratamientos en donde se encontraban los inhibidores, el caldo MRS proporcionó a las bacterias los nutrientes necesarios y un ambiente favorable para defenderse del ataque de los bacteriófagos.

V.7 Evaluación del efecto antimicrobiano de bacteriófagos seleccionados sobre cepas de BAL y su producción de AB durante la fermentación de mosto de cerveza

Para evaluar el efecto antimicrobiano de los bacteriófagos contra las cepas de BAL y su producción de AB, se inocularon unidades experimentales de 120 mL de mosto para cerveza con la cepa susceptible a concentración de ~ 5 Log UFC/mL y el fago ~ 1 Log UFP/mL, como controles se empleó el mosto sin inocular y el mosto inoculado con la bacteria sin bacteriófago. Todos los mostos se fermentaron a 18°C durante 13 días, mientras se monitoreaba la densidad. El porcentaje de etanol, pH y acidez se evaluaron al final de la fermentación, mientras que las poblaciones microbianas y concentración de aminas biogénicas se cuantificaron a mitad y final de la fermentación, mediante conteo en placa y HPLC respectivamente.

La fermentación terminó a los 13 días con una densidad de 1.018 ± 0.016 g/mL para el mosto control, 1.012 ± 0.002 g/mL para el mosto con la bacteria *L. brevis* C18 y 1.016 ± 0.001 g/mL para el mosto con la bacteria *L. brevis* C18 y el fago 44M3 (Figura 16, a). No se observó diferencia en la densidad alcanzada entre el tratamiento con respecto a los controles. Además, las densidades estuvieron dentro

del rango señalado por el cervecero para el producto final las cuales se encuentran entre 1.010 a 1.016 g/ml.

En cuanto al porcentaje de alcohol, se logró obtener 4.33 ± 0.23 % para el mosto control, lo cual difirió del porcentaje reportado en el producto comercial el cual es de 5.6 %. Considerando el estilo de la cerveza y la adición de miel a la formulación, esta se clasifica como una Experimental India Pale Ale (IPA) y con base en lo establecido por la Brewers Association, (2023); para este estilo de cerveza el porcentaje debe estar entre el 5.0 y 8.4 %, por lo que la fermentación control no cumplió con el porcentaje de alcohol señalado. Factores biológicos como la competencia microbiana por los nutrientes pueden generar disminución en la producción de etanol (Tse et al., 2021). Por ejemplo: las enterobacterias que hayan ingresado al proceso pueden metabolizar carbohidratos a través de la vía Embden-Meyerhof-Parnas durante los primeros días de la fermentación y disminuir los nutrientes disponibles para la levadura (De Roos & De Vuyst, 2019).

El porcentaje de etanol en el mosto con la bacteria fue de 5.21 ± 0.26 %, esto pudo deberse a que *L. brevis* es una BAL heterofermentativa que no solo transforma las hexosas en ácido láctico, CO₂ y ácido acético, sino que también puede transformarlas a etanol (De Roos & De Vuyst, 2019). En el mosto con la bacteria y el fago el porcentaje fue de 4.85 ± 0.34 % (Figura 15, b) y no se observó diferencia con respecto a ambos controles.

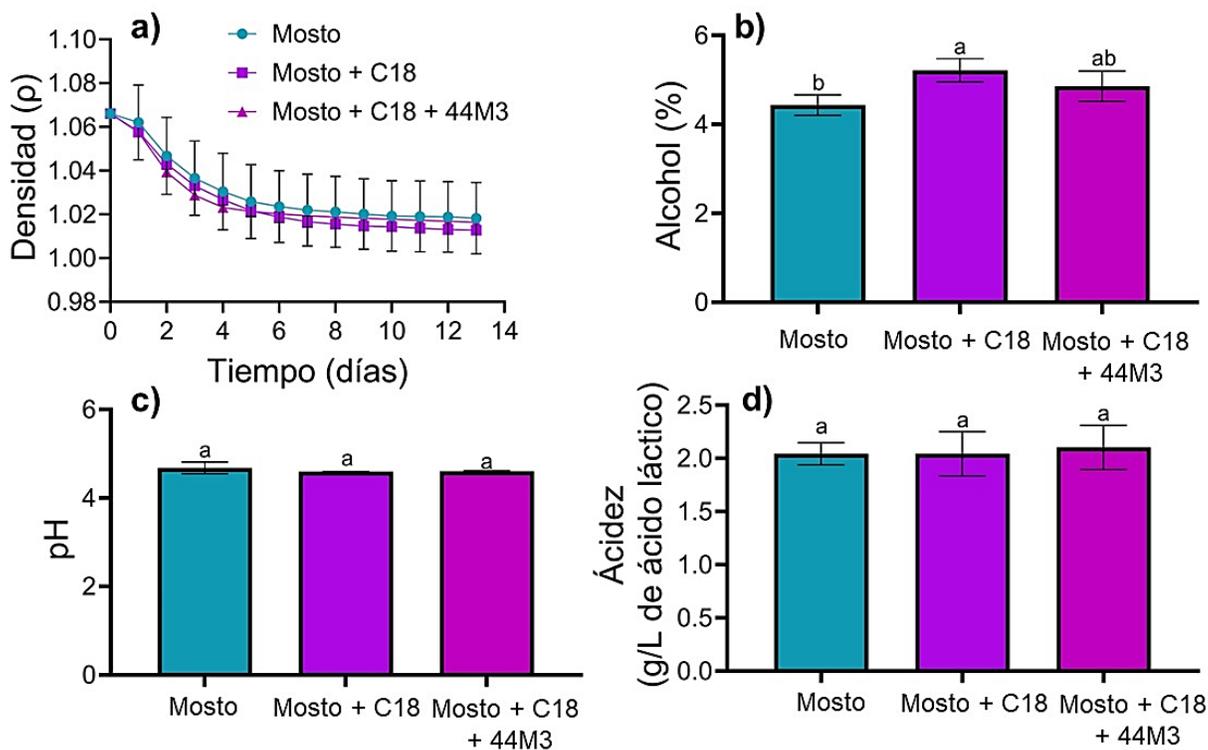


Figura 16. a) Evolución de la fermentación de mosto para cerveza. Características químicas de la cerveza al final de fermentación b) Porcentaje de alcohol, c) pH y d) acidez en g/L de ácido láctico. Las letras diferentes representan diferencia significativa con $p < 0.05$, $n=3$ (prueba Tukey).

El pH final fue de 4.68 ± 0.13 , 4.59 ± 0.00 y 4.60 ± 0.01 para el mosto, mosto con bacteria y mosto con bacteria y fago respectivamente (Figura 16, c); no se observó diferencia entre el tratamiento y los controles. Este se mantuvo dentro de lo reportado por Liguori et al. (2020) para una cerveza estilo IPA de origen alemana, el cual fue de 4.77 ± 0.09 y con los valores reportados por Silva et al. (2022) para 3 cervezas del mismo estilo los cuales oscilaron entre 4.61 ± 0.01 y 4.84 ± 0.04 . El pH por debajo de los 3.8 indica posible contaminación microbiana y desviación en la fermentación (Sadler, 2020). De igual manera la acidez se mantuvo sin diferencia entre el tratamiento y los controles con valores entre 2.04 ± 0.20 g/L y 2.10 ± 0.20 g/L de ácido láctico (Figura 15, d) similares a los reportados por Mudura et al. (2016) los cuales se encuentran entre 2.12 ± 0.10 y 2.17 ± 0.10 para el estilo de cerveza.

La cuantificación de las poblaciones microbianas en el mosto antes y después del inóculo a los 0, 3 y 13 días, indican que el mosto ya contenía poblaciones bacterianas en concentraciones de 3.14 ± 0.03 Log UFC/mL.

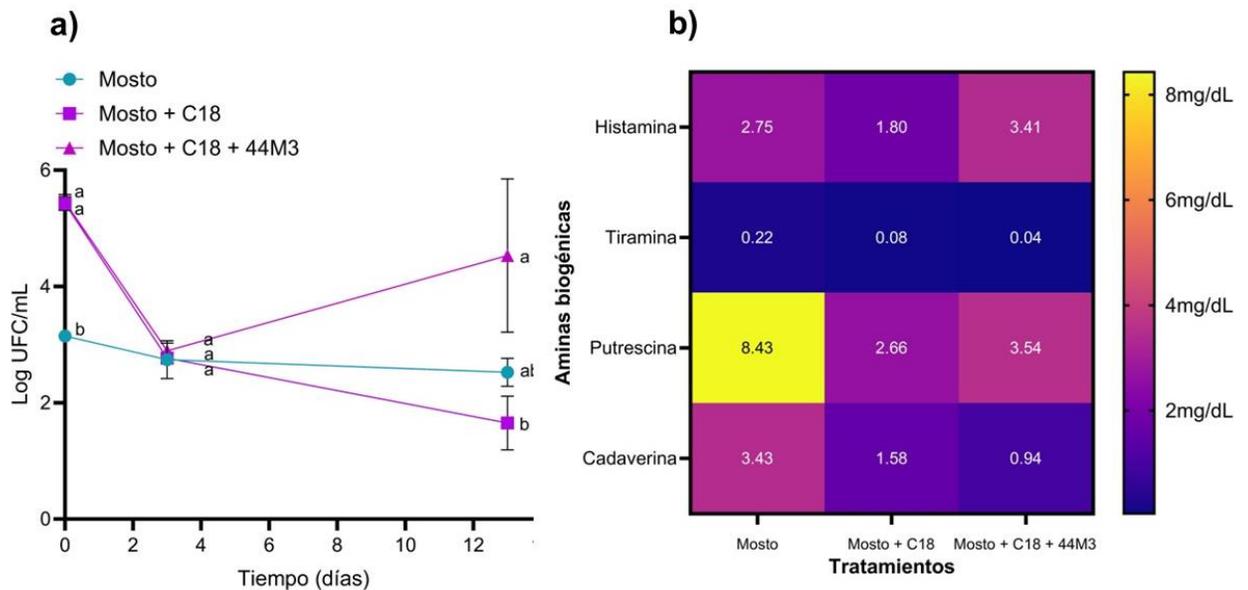


Figura 17. a) Cinética de *L. brevis* C18 durante la fermentación del mosto en el tratamiento y los controles. b) Concentraciones de AB encontradas en el tratamiento y los controles. Las letras diferentes representan diferencia significativa con $p < 0.05$, $n=3$ (prueba Tukey).

El inóculo de la cepa de *L. brevis* C18 fue de 5.42 ± 0.11 para el mosto con C18 y 5.45 ± 0.13 Log UFC/mL para el mosto con C18 y el fago 44M3. A los 3 días, las poblaciones rondaron entre 2.74 ± 0.32 y 2.89 ± 0.13 Log UFC/mL. Se sabe que las levaduras *S. cerevisiae* dominan el proceso de fermentación (Albergaria & Arneborg, 2016) durante los primeros días y las BAL que son resistentes al etanol y a los compuestos antimicrobianos del lúpulo pueden sobrevivir y mantenerse presentes en bajas concentraciones durante esta etapa (Fleet et al., 1984).

Al final de la fermentación se observaron incrementos en las poblaciones del tratamiento con el fago alcanzando concentraciones de 4.53 ± 1.31 Log UFC/mL, la cual fue superior a ambos controles Mosto y Mosto + C18, que se encontraron en

2.52 ± 0.24 y 1.65 ± 0.46 Log UFC/mL, respectivamente (Figura 17, a). Los incrementos de las poblaciones en el tratamiento con fago pudieran deberse a que este disminuyó la competencia por nutrientes a las bacterias nativas del mosto, mientras que en el mosto con la cepa *L. brevis* C18 se limitó el desarrollo de las bacterias nativas; situación similar sucedió con *Weissella cibaria* KCTC 3807 cuya lisis por fagos favoreció el desarrollo de *Leuconostoc citreum* KCCM 12030 (Kong & Park, 2019). Las BAL impiden el desarrollo de otras bacterias al producir compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas, lo que elimina la competencia por nutrientes y les da ventaja en el medio (Tse et al., 2021). Además, para superar el estrés a los ambientes ácidos las BAL pueden activar cuatro sistemas principales que son la glutamato descarboxilasa, la lisina descarboxilasa, la arginina desiminasa y la multisubunidad F1Fo ATPasa (Azcarate-Peril & Klaenhammer, 2010). El metabolismo de aminoácidos es distintivo de las BAL heterofermentativas como *L. brevis* lo que conduce a la producción de AB (Geissler et al., 2016).

Las poblaciones microbianas concuerdan con las concentraciones de AB obtenidas en los controles y el tratamiento al final de la fermentación. El mosto contenía poblaciones microbianas productoras de AB las cuales produjeron en total 14.84 mg/L de AB, siendo este el medio con la mayor producción y concentración de AB (Figura 17 b). En todos los controles y el tratamiento se observaron altas concentraciones de putrescina, siendo esta la AB más predominante. La presencia de putrescina no solo está relacionada al metabolismo de los microorganismos durante el proceso de fermentación, sino que también puede provenir de las materias primas como la malta y el lúpulo (Papageorgiou et al., 2018). Autores como Angulo et al. (2020) encontraron que la putrescina fue la AB con mayor concentración en 3 tipos de cerveza oscilando entre los 9.48 – 72.18 mg/L. Mientras que Bertuzzi et al. (2020) y Nalazek-Rudnicka et al. (2021) reportaron concentraciones de 3.32 a 5.61 mg/L y 3.69 a 12.20 mg/L de putrescina en diferentes estilos de cerveza artesanal. En lo que respecta a la tiramina (trazas a 31.71 mg/L) fue la segunda amina biogénica con mayor concentración, seguida de

histamina (0.15 a 4.9 mg/L) y cadaverina (trazas a 3.64 mg/L) lo que concuerda con lo encontrado en el presente proyecto.

La concentración total de AB en el mosto con la cepa C18 fue de 6.12 mg/L, mientras que para el mosto con la bacteria y el fago fue de 7.93 mg/L. Como ya se había mencionado antes, las BAL pueden competir por nutrientes con otros microorganismos presentes, por lo que el fago reduce esta competencia y beneficia a la población nativa, lo que es compatible con la concentración de AB encontradas en el tratamiento con el fago. En cerveza, la producción de AB no sólo se encuentra relacionada al metabolismo de BAL como *Lactilactobacillus curvatus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Levilactobacillus brevis*, *Fructilactobacillus lindneri*, *Enterococcus faecium*, entre otras; sino también al metabolismo de la familia Enterobacteriaceae (que desarrollan al inicio de la fermentación), *Staphylococcus xylosus* y algunas levaduras como *Brettanomyces spp.* las cuales no son afectadas por el fago 44M3 y pueden continuar con su actividad metabólica, incluso las BAL que no se encuentren dentro del rango de hospederos del fago (Barbieri et al., 2019; Crauwels et al., 2015; Poveda et al., 2017; Świder et al., 2023; Yang et al., 2023; Yu et al., 2019).

del Rio et al. (2019) evaluaron el fago 156 que infecta a *Enterococcus faecalis*, productora de tiramina y putrescina en queso de cabrales y encontraron una reducción de ~ 95% de tiramina y ~ 80 % de putrescina a los 60 días de fermentación; mientras que Ladero et al. (2016) observaron reducción de 85% de tiramina al inhibir a *E. faecalis* con el fago Q69. La razón por la cual en estos trabajos se observó el efecto del fago, puede deberse a que para la elaboración del queso emplearon leche pasteurizada y cultivos iniciadores no productores de AB, lo que minimizó la probabilidad de microbiota productora de AB. Además, las concentraciones de fago y bacteria fueron de 3 Log UFP/mL y 4 Log UFC/mL respectivamente en ambos reportes, lo que pudo causar una mayor reducción de la bacteria objetivo y por ende en la concentración de AB.

Esto, refuerza la idea de emplear cocteles de fagos para reducir las diversas poblaciones que producen aminos biogénicas ampliando el espectro de actividad lítica, así como evitar la activación de mecanismos de defensa (Chan et al., 2013).

VI. CONCLUSIONES

El presente trabajo nos mostró que cada bacteriófago requiere de un proceso de estandarización para la propagación, mientras que el agar bacteriológico favoreció la conservación de las partículas del bacteriófago 8M2 y permitió la conservación del resto de los fagos.

Los bacteriófagos aislados pueden infectar un rango amplio de cepas productoras de AB, con una actividad inhibitoria muy prometedora. Dentro de las condiciones en las que se evaluaron los fagos, la presencia del lúpulo, etanol y el bajo pH potencian el efecto inhibitorio de los bacteriófagos evaluados.

Las cepas de BAL evaluadas poseen la capacidad de sobrevivir a las condiciones de estrés del medio y desarrollar mecanismos de defensa antifagos cuando se encuentran en ambientes favorables.

El control de las poblaciones de bacterias productoras de AB es más compleja de lo que parece, ya que esto sugiere abordar cuestiones relacionadas a la competencia de nutrientes y a las relaciones entre las poblaciones bacterianas, por lo que debe analizarse desde un punto de vista integral. Se sugiere el uso de cocteles de fagos con mayor eficacia que permita combatir a una diversidad bacteriana mayor que puedan estar presentes en el alimento en que se pretende aplicar.

Este es el primer trabajo de control de AB en cerveza artesanal con bacteriófagos, que permitió evidenciar las limitantes de su aplicación y las perspectivas a abordar en trabajos futuros. Los bacteriófagos tiene potencial para generar una alternativa para el control de la producción de AB en cerveza.

VII. REFERENCIAS

- Abdelsattar, A., Dawoud, A., Makky, S., Nofal, R., Aziz, R., & El-Shibiny, A. (2022). Bacteriophages: from Isolation to Application. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 23(3), 337–360. <https://doi.org/10.2174/1389201022666210426092002>
- Abedon, S. T. (2018). Detection of Bacteriophages: Phage Plaques. In *Bacteriophages* (pp. 1–32). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_16-1
- Abedon, S. T. (2021). General Ecology of Bacteriophages. In *Encyclopedia of Virology* (pp. 314–321). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20955-2>
- Abedon, S. T. (2023). Bacteriophage Adsorption: Likelihood of Virion Encounter with Bacteria and Other Factors Affecting Rates. *Antibiotics*, 12(4), 723. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040723>
- Ackermann, H.-W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*, 146(5), 843–857. <https://doi.org/10.1007/s007050170120>
- Ackermann, H.-W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2), 227–243. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>
- Ackermann, H.-W. (2009). *Bacteriophages* (M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski, Eds.; Vol. 501). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6>
- Ainsworth, S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Courtin, P., Guerardel, Y., Mahony, J., Grard, T., Cambillau, C., Chapot-Chartier, M.-P., & van Sinderen, D. (2014). Differences in Lactococcal Cell Wall Polysaccharide Structure Are Major Determining Factors in Bacteriophage Sensitivity. *MBio*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00880-14>
- Albergaria, H., & Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2035–2046. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7255-0>
- Alharbi, N. M., & Ziadi, M. M. (2021). Wastewater as a fertility source for novel bacteriophages against multi-drug resistant bacteria. In *Saudi Journal of*

- Biological Sciences* (Vol. 28, Issue 8, pp. 4358–4364). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.025>
- American Society of Brewing Chemists. (2023). *Beer 23. Bitterness Units (BU), Manual Isooctane Extraction (IM)*. <https://www.asbcnet.org/Methods/BeerMethods/Pages/Beer-23-MasterMethod.aspx>
- Angulo, M. F., Flores, M., Aranda, M., & Henriquez-Aedo, K. (2020). Fast and selective method for biogenic amines determination in wines and beers by ultra high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 309. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125689>
- Ávila, M., Sánchez, C., Calzada, J., Mayer, M. J., Berruga, M. I., López-Díaz, T. M., Narbad, A., & Garde, S. (2023). Isolation and characterization of new bacteriophages active against *Clostridium tyrobutyricum* and their role in preventing the late blowing defect of cheese. *Food Research International*, 163, 112222. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112222>
- Aymerich, T., Garriga, M., & Monfort, J. (2011). Applications of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in fermented meat products. In *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation* (pp. 297–323). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857090522.3.297>
- Azcarate-Peril, M. A., & Klaenhammer, T. R. (2010). Genomics of Lactic Acid Bacteria: The Post-Genomics Challenge—From Sequence to Function. In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria* (pp. 35–56). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780813820866.ch2>
- Baiano, A. (2021). Craft beer: An overview. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 20, Issue 2, pp. 1829–1856). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12693>
- Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F., & Tabanelli, G. (2019). Biogenic amine production by lactic acid bacteria: A review. In *Foods* (Vol. 8, Issue 1). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/foods8010017>
- Barker, C., & Park, S. F. (2001). Sensitization of *Listeria monocytogenes* to Low pH, Organic Acids, and Osmotic Stress by Ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1594–1600. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1594-1600.2001>

- Batinovic, Wassef, Knowler, Rice, Stanton, Rose, Tucci, Nittami, Vinh, Drummond, Sobey, Chan, Seviour, Petrovski, & Franks. (2019). Bacteriophages in Natural and Artificial Environments. *Pathogens*, 8(3), 100. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030100>
- Bertuzzi, T., Mulazzi, A., Rastelli, S., Donadini, G., Rossi, F., & Spigno, G. (2020). Targeted healthy compounds in small and large-scale brewed beers. *Food Chemistry*, 310. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125935>
- Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>
- Brady, A., Felipe-Ruiz, A., Gallego Del Sol, F., Marina, A., Quiles-Puchalt, N., & Penadés, J. R. (2021). *Annual Review of Microbiology Molecular Basis of Lysis-Lysogeny Decisions in Gram-Positive Phages*. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-033121>
- Brewers Association. (2023). *Beer Style Guidelines*. <https://www.brewersassociation.org/edu/brewers->
- Briggiler Marcó, M., & Mercanti, D. J. (2021). Bacteriophages in dairy plants. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 97, pp. 1–54). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2021.02.015>
- Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A., & Stevens, R. (2004). The science of mashing. In *Brewing* (pp. 85–170). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781855739062.85>
- Capitello, R., & Maehle, N. (2020). Case Studies in the Beer Sector. In *Case Studies in the Beer Sector*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817734-1.00022-7>
- Capra, M. L., Binetti, A. G., Mercanti, D. J., Quiberoni, A., & Reinheimer, J. A. (2009). Diversity among *Lactobacillus paracasei* phages isolated from a probiotic dairy product plant. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), 1350–1357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04313.x>
- Carvalho, N. B., Minim, L. A., Nascimento, M., Ferreira, G. H. de C., & Minim, V. P. R. (2018). Characterization of the consumer market and motivations for the consumption of craft beer. *British Food Journal*, 120(2), 378–391. <https://doi.org/10.1108/BFJ-04-2017-0205>
- Chan, B. K., Abedon, S. T., & Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology*, 8(6), 769–783. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.47>

- Choińska-Pulit, A., Mituła, P., Śliwka, P., Łaba, W., & Skaradzińska, A. (2015). Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 45, Issue 2, pp. 212–221). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.001>
- Ciont, C., Epuran, A., Kerezsi, A. D., Coldea, T. E., Mudura, E., Pasqualone, A., Zhao, H., Suharoschi, R., Vriesekoop, F., & Pop, O. L. (2022). Beer Safety: New Challenges and Future Trends within Craft and Large-Scale Production. In *Foods* (Vol. 11, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods11172693>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02931>
- Costantini, A., Doria, F., Saiz, J.-C., & Garcia-Moruno, E. (2017). Phage-host interactions analysis of newly characterized *Oenococcus oeni* bacteriophages: Implications for malolactic fermentation in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 246, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.020>
- Crauwels, S., Steensels, J., Aerts, G., Willems, K. A., Verstrepen, K. J., Lievens, B., Crauwels, A. S., Steensels, J., Aerts, G., Willems, K. A., Verstrepen, K. J., & Lievens, B. (2015). *Brettanomyces* *Bruxellensis*, Essential Contributor in Spontaneous Beer Fermentations Providing Novel Opportunities for the Brewing Industry. In *Yearbook* (Vol. 68). www.brauwissenschaft.de
- de Jonge, P. A., Nobrega, F. L., Brouns, S. J. J., & Dutilh, B. E. (2019). Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range. *Trends in Microbiology*, 27(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.006>
- de la Torre, C. A. L., & Conte-Junior, C. A. (2018). Detection of Biogenic Amines: Quality and Toxicity Indicators in Food of Animal Origin. In *Food Control and Biosecurity* (Vol. 16, pp. 225–257). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811445-2.00006-4>
- De Roos, J., & De Vuyst, L. (2019). Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 25–38. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9291>
- del Rio, B., Sánchez-Llana, E., Redruello, B., Magadan, A. H., Fernández, M., Martín, M. C., Ladero, V., & Alvarez, M. A. (2019). *Enterococcus faecalis* Bacteriophage 156 Is an Effective Biotechnological Tool for Reducing the Presence of Tyramine and Putrescine in an Experimental Cheese Model. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00566>

- Dennehy, J. J., & Abedon, S. T. (2021). Bacteriophage Ecology. In *Bacteriophages* (pp. 253–294). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41986-2_8
- Dini, C., & de Urraza, P. J. (2013). Effect of buffer systems and disaccharides concentration on Podoviridae coliphage stability during freeze drying and storage. *Cryobiology*, 66(3), 339–342. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.03.007>
- Dowah, A. S. A., & Clokie, M. R. J. (2018). Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria. In *Biophysical Reviews* (Vol. 10, Issue 2, pp. 535–542). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0382-3>
- Dunne, M., Hupfeld, M., Klumpp, J., & Loessner, M. J. (2018). Molecular basis of bacterial host interactions by gram-positive targeting bacteriophages. In *Viruses* (Vol. 10, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v10080397>
- Dykes, G. A., & Moorhead, S. M. (2002). Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *International Journal of Food Microbiology*, 73(1), 71–81. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00710-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00710-3)
- Edyta Kordialik-Bogacka. (2022). Biopreservation of beer: Potential and constraints. *Biotechnology Advances*, 58.
- Eid, S., Tolba, H. M. N., Hamed, R. I., & Al-Atfeehy, N. M. (2022). Bacteriophage therapy as an alternative biocontrol against emerging multidrug resistant *E. coli* in broilers. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(5), 3380–3389. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.02.015>
- Ekici, K., & Omer, A. K. (2020). Biogenic amines formation and their importance in fermented foods. *BIO Web of Conferences*, 17, 00232. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20201700232>
- Endersen, L., & Coffey, A. (2020). The use of bacteriophages for food safety. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 36, pp. 1–8). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.006>
- Erzinger, G. S., Lopes, P. C., del Ciampo, L. F., Zimath, S. C., Vicente, D., Martins de Albuquerque, F., & Prates, R. C. (2021). Bioactive compounds of hops resulting from the discarding of the beer industry in the control of pathogenic bacteria. In *Natural Bioactive Compounds* (pp. 41–55). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820655-3.00003-3>

- Esmael, A., Azab, E., Gobouri, A. A., Nasr-eldin, M. A., Moustafa, M. M. A., Mohamed, S. A., Badr, O. A. M., & Abdelatty, A. M. (2021). Isolation and characterization of two lytic bacteriophages infecting a multi-drug resistant salmonella typhimurium and their efficacy to combat salmonellosis in ready-to-use foods. *Microorganisms*, 9(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020423>
- Feyereisen, M., Mahony, J., Lugli, G. A., Ventura, M., Neve, H., Franz, C. M. A. P., Noben, J. P., O'Sullivan, T., & Van Sinderen, D. (2019). Isolation and characterization of Lactobacillus brevis Phages. *Viruses*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/v11050393>
- Feyereisen, M., Mahony, J., O'Sullivan, T., Boer, V., & Sinderen, D. (2020). Beer spoilage and low pH tolerance is linked to manganese homeostasis in selected *Lactobacillus brevis* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 129(5), 1309–1320. <https://doi.org/10.1111/jam.14730>
- Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S., & Ribreau-Gayon, P. (1984). Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(5), 1034–1038. <https://doi.org/10.1128/aem.48.5.1034-1038.1984>
- Garavaglia, C., & Swinnen, J. (2017). Economics of the craft beer revolution: A comparative international perspective. In *Economic Perspectives on Craft Beer: A Revolution in the Global Beer Industry* (pp. 3–51). Palgrave Macmillan. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58235-1_1
- Garneau, J. E., & Moineau, S. (2011). Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories*, 10(Suppl 1), S20. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S20>
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Taccari, M., Aquilanti, L., & Clementi, F. (2015). The occurrence of beer spoilage lactic acid bacteria in craft beer production. *Journal of Food Science*, 80(12), M2845–M2852. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13112>
- Garvey, M. (2022). Bacteriophages and Food Production: Biocontrol and Bio-Preservation Options for Food Safety. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101324>
- Geissler, A. J., Behr, J., von Kamp, K., & Vogel, R. F. (2016). Metabolic strategies of beer spoilage lactic acid bacteria in beer. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.016>

- Grandvalet, C., Assad-García, J. S., Chu-Ky, S., Tollot, M., Guzzo, J., Gresti, J., & Tourdot-Maréchal, R. (2008). Changes in membrane lipid composition in ethanol- and acid-adapted *Oenococcus oeni* cells: characterization of the *cfa* gene by heterologous complementation. *Microbiology*, *154*(9), 2611–2619. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/016238-0>
- Greer, G. G., Dilts, B. D., & Ackermann, H. W. (2007). Characterization of a *Leuconostoc gelidum* bacteriophage from pork. *International Journal of Food Microbiology*, *114*(3), 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.021>
- Guerra-Tamez, C. R., Dávila-Aguirre, M. C., Barragán Codina, J. N., & Guerra Rodríguez, P. (2021). Analysis of the Elements of the Theory of Flow and Perceived Value and Their Influence in Craft Beer Consumer Loyalty. *Journal of International Food and Agribusiness Marketing*, *33*(5), 487–517. <https://doi.org/10.1080/08974438.2020.1823929>
- Haakensen, M., Schubert, A., & Ziola, B. (2009). Broth and agar hop-gradient plates used to evaluate the beer-spoilage potential of *Lactobacillus* and *Pediococcus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, *130*(1), 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.001>
- Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V. N., & Balcão, V. M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*, *212–213*, 38–58. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007>
- Hill, A. E. (2016). Microbiology. In *Brewing Materials and Processes: A Practical Approach to Beer Excellence* (pp. 291–315). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799954-8.00014-9>
- Holbrook, C. J. (2019). Brewhouse operations. In *The Craft Brewing Handbook: a Practical Guide to Running a Successful Craft Brewery* (pp. 65–109). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102079-1.00003-5>
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). *Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance* (pp. 217–248). [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1)
- Jairath, G., Singh, P. K., Dabur, R. S., Rani, M., & Chaudhari, M. (2015). Biogenic amines in meat and meat products and its public health significance: a review. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 52, Issue 11, pp. 6835–6846). Springer India. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1860-x>
- Jończyk-Matysiak, E., Łodej, N., Kula, D., Owczarek, B., Orwat, F., Międzybrodzki, R., Neuberg, J., Bagińska, N., Weber-Dąbrowska, B., & Górski, A. (2019). Factors determining phage stability/activity: challenges in practical phage

- application. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 17(8), 583–606. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1646126>
- Kazi, M., & Annapure, U. S. (2016). Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *Journal of Food Science and Technology*, 53(3), 1355–1362. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1996-8>
- Kelly, D., O’Sullivan, O., Mills, S., McAuliffe, O., Ross, R. P., Neve, H., & Coffey, A. (2012). Genome sequence of the phage cIP1, which infects the beer spoilage bacterium *Pediococcus damnosus*. *Gene*, 504(1), 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.085>
- Khan Mirzaei, M., & 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), e0118557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118557>
- Kim, S. A., Jeon, S. H., Kim, N. H., Kim, H. W., Lee, N. Y., Cho, T. J., Jung, Y. M., Lee, S. H., Hwang, I. G., & Rhee, M. S. (2015). Changes in the microbial composition of microbrewed beer during the process in the actual manufacturing line. *Journal of Food Protection*, 78(12), 2233–2239. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-261>
- Kim, S. G., Lee, Y. D., Park, J. H., & Moon, G. S. (2019). Synergistic inhibition by bacteriocin and bacteriophage against staphylococcus aureus. *Food Science of Animal Resources*, 39(6), 1015–1020. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e95>
- Kong, S., & Park, J.-H. (2019). Effect of Bacteriophages on Viability and Growth of Co-cultivated *Weissella* and *Leuconostoc* in Kimchi Fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 558–561. <https://doi.org/10.4014/jmb.1902.02023>
- Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Johnson, L., & Johnson, R. P. (2009). *Bacteriophages* (M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski, Eds.; Vol. 501). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6>
- Kutter, E. (2009). Phage Host Range and Efficiency of Plating. In M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Eds.), *Bacteriophages* (Vol. 501). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6>
- Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 5, pp. 317–327). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>

- Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M., & Alvarez, M. A. (2010). Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. In *Current Nutrition & Food Science* (Vol. 6).
- Ladero, V., Gómez-Sordo, C., Sánchez-Llana, E., del Rio, B., Redruello, B., Fernández, M., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2016). Q69 (an E. faecalis-Infecting Bacteriophage) As a Biocontrol Agent for Reducing Tyramine in Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00445>
- Ledormand, P., Desmasures, N., & Dalmaso, M. (2021). Phage community involvement in fermented beverages: an open door to technological advances? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(17), 2911–2920. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1790497>
- Legrand, P., Collins, B., Blangy, S., Murphy, J., Spinelli, S., Gutierrez, C., Richet, N., Kellenberger, C., Desmyter, A., Mahony, J., van Sinderen, D., & Cambillau, C. (2016). The Atomic Structure of the Phage Tuc2009 Baseplate Tripod Suggests that Host Recognition Involves Two Different Carbohydrate Binding Modules. *MBio*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.01781-15>
- León-Félix, J., & Villicaña, C. (2021). The Impact of Quorum Sensing on the Modulation of Phage-Host Interactions. *Journal of Bacteriology*, 203(11). <https://doi.org/10.1128/JB.00687-20>
- Lewis, R., & Hill, C. (2020). Overcoming barriers to phage application in food and feed. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.018>
- Liguori, L., De Francesco, G., Perretti, G., & Albanese, D. (2020). Characterization of the main physico-chemical parameters in three styles of craft beer. *2020 IEEE International Workshop on Metrology for Agriculture and Forestry (MetroAgriFor)*, 314–318. <https://doi.org/10.1109/MetroAgriFor50201.2020.9277673>
- Longo, A., & Spano, G. (2019). *Food Molecular Microbiology* (S. Paramithiotis & J. K. Patra, Eds.; 1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315110110>
- López-Gazucho, A. J., Redondo-Solano, M., Hernández-Iturriaga, M., Miranda-Castilleja, D., Amaya-Llano, S., & Arvizu-Medrano, S. M. (2023). *Aislamiento y caracterización de bacteriófagos con actividad inhibitoria de bacterias deterioradoras en cerveza artesanal*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Lorencová, E., Salek, R. N., Černíková, M., Buňková, L., Hýlková, A., & Buňka, F. (2020). Biogenic amines occurrence in beers produced in Czech

- microbreweries. *Food Control*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107335>
- Lu, Z., Breidt, F., Plengvidhya, V., & Fleming, H. P. (2003). Bacteriophage Ecology in Commercial Sauerkraut Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3192–3202. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3192-3202.2003>
- Maimaiti, Z., Li, Z., Xu, C., Chen, J., & Chai, W. (2023). Global trends and hotspots of phage therapy for bacterial infection: A bibliometric visualized analysis from 2001 to 2021. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1067803>
- Menz, G., Aldred, P., & Vriesekoop, F. (2009). Pathogens in Beer. In *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 403–413). Elsevier Inc.
- Moye, Z. D., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage applications for food production and processing. In *Viruses* (Vol. 10, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v10040205>
- Mudgal, P., Breidt, F., Lubkin, S. R., & Sandeep, K. P. (2006). Quantifying the significance of phage attack on starter cultures: A mechanistic model for population dynamics of phage and their hosts isolated from fermenting sauerkraut. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3908–3915. <https://doi.org/10.1128/AEM.02429-05>
- Mudura, E., Coldea, T. E., Rotar, A. M., Pop, C., & Semeniuc, C. (2016). Characterization of Romanian Craft Beers Based on Chemical Composition and Microbiological Analysis. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, 73(1). <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:11990>
- Municipio de Querétaro. (2019). *La cerveza artesanal en Querétaro, toda una experiencia de sabor, tradición y creatividad: Luis Nava*. Municipio de Querétaro . <https://municipiodequeretaro.gob.mx/la-cerveza-artesanal-en-queretaro-toda-una-experiencia-de-sabor-tradicion-y-creatividad-luis-nava/>
- Nachimuthu, R., Madurantakam Royam, M., Manohar, P., & Leptihn, S. (2021). Application of bacteriophages and endolysins in aquaculture as a biocontrol measure. *Biological Control*, 160, 104678. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104678>
- Nafarrate, I., Mateo, E., Amárita, F., de Marañón, I. M., & Lasagabaster, A. (2020). Efficient isolation of Campylobacter bacteriophages from chicken skin, analysis of several isolation protocols. *Food Microbiology*, 90, 103486. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103486>

- Nalazek-Rudnicka, K., Wojnowski, W., & Wasik, A. (2021). Occurrence and levels of biogenic amines in beers produced by different methods. *Foods*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/foods10122902>
- Nuñez, M., del Olmo, A., & Calzada, J. (2015). Biogenic Amines. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 416–423). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00070-2>
- O’Connell, L., Marcoux, P. R., & Roupioz, Y. (2021). Strategies for Surface Immobilization of Whole Bacteriophages: A Review. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *7*(6), 1987–2014. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00013>
- Omer, A. K., Mohammed, R. R., Mohammed Ameen, P. S., Abas, Z. A., & Ekici, K. (2021). Presence of biogenic amines in food and their public health implications: A review. In *Journal of Food Protection* (Vol. 84, Issue 9, pp. 1539–1548). International Association for Food Protection. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-047>
- O’Sullivan, L., Bolton, D., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2019). Bacteriophages in Food Applications: From Foe to Friend. *Annual Review of Food Science and Technology*, *10*(1), 151–172. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121747>
- Ovalle-Marmolejo, X. Y., Redondo-Solano, M., Granados-Chinchilla, F., Miranda-Castilleja, D. E., & Arvizu-Medrano, S. M. (2023). Effect of stress factors on the production of biogenic amines by lactic acid bacteria isolated from fermented Mexican foods (cheese and beer). *Food Control*, *146*, 109553. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109553>
- Paillet, T., & Dugat-Bony, E. (2021). Bacteriophage ecology of fermented foods: anything new under the sun? In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 40, pp. 102–111). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.03.007>
- Papageorgiou, M., Lambropoulou, D., Morrison, C., Kłodzińska, E., Namieśnik, J., & Płotka-Wasyłka, J. (2018). Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 98, pp. 128–142). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.001>
- Parker, D. K. (2012). Beer: production, sensory characteristics and sensory analysis. In *Alcoholic Beverages* (pp. 133–158). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857095176.2.133>
- Philippe, C., Cornuault, J. K., de Melo, A. G., Morin-Pelchat, R., Jolicoeur, A. P., & Moineau, S. (2023). The never-ending battle between lactic acid bacteria and

- their phages. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(4).
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuad035>
- Poveda, J. M. (2019). Biogenic amines and free amino acids in craft beers from the Spanish market: A statistical approach. *Food Control*, 96, 227–233.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.012>
- Poveda, J. M., Ruiz, P., Seseña, S., & Palop, M. L. (2017). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria during a craft brewing process. *LWT*, 85, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.003>
- Prester, L. (2016). Biogenic amines in ready-to-eat foods. In *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* (pp. 397–416). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801916-0.00022-4>
- Redruello, B., Ladero, V., del Rio, B., Fernández, M., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2017). A UHPLC method for the simultaneous analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ions in beer. *Food Chemistry*, 217, 117–124.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.040>
- Rendueles, C., Duarte, A. C., Escobedo, S., Fernández, L., Rodríguez, A., García, P., & Martínez, B. (2022). Combined use of bacteriocins and bacteriophages as food biopreservatives. A review. *International Journal of Food Microbiology*, 368, 109611. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109611>
- Reyes-Robles, T., Dillard, R. S., Cairns, L. S., Silva-Valenzuela, C. A., Housman, M., Ali, A., Wright, E. R., & Camilli, A. (2018). *Vibrio cholerae* Outer Membrane Vesicles Inhibit Bacteriophage Infection. *Journal of Bacteriology*, 200(15).
<https://doi.org/10.1128/JB.00792-17>
- Rodhouse, L., & Carbonero, F. (2019). Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 59, Issue 3, pp. 462–473). Taylor and Francis Inc.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1378616>
- Rodríguez-Saavedra, M., González de Llano, D., & Moreno-Arribas, M. V. (2020). Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: Microbiological quality and food safety. *Food Research International*, 138, 109762.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109762>
- Romero, D. A., Magill, D., Millen, A., Horvath, P., & Fremaux, C. (2020). Dairy lactococcal and streptococcal phage–host interactions: an industrial perspective in an evolving phage landscape. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6), 909–932.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa048>

- Ross, A., Ward, S., & Hyman, P. (2016). More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01352>
- Sadler, N. (2019). Quality assurance and control, product safety and testing. In *The Craft Brewing Handbook: a Practical Guide to Running a Successful Craft Brewery* (pp. 153–190). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102079-1.00006-0>
- Sadler, N. (2020). Quality assurance and control, product safety and testing. In *The Craft Brewing Handbook* (pp. 153–190). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102079-1.00006-0>
- Saguir, F. M., Sajur, S. A., Pérez, M. B., Savino, M. J., & Maturano, C. (2019). Enzymatic activities and fermentation products of lactic acid bacteria from fruits and fermented beverages. incidence on food quality. In *Quality Control in the Beverage Industry: Volume 17: The Science of Beverages* (pp. 491–528). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816681-9.00014-X>
- Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., & Belshaw, R. (2010). Viral Mutation Rates. *Journal of Virology*, 84(19), 9733–9748. <https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10>
- Schurr, B. C., Hahne, H., Kuster, B., Behr, J., & Vogel, R. F. (2015). Molecular mechanisms behind the antimicrobial activity of hop iso- α -acids in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology*, 46, 553–563. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.017>
- Sentellas, S., Núñez, Ó., & Saurina, J. (2016). Recent Advances in the Determination of Biogenic Amines in Food Samples by (U)HPLC. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 64, Issue 41, pp. 7667–7678). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02789>
- Seo, S. O., Park, S. K., Jung, S. C., Ryu, C. M., & Kim, J. S. (2020). Anti-contamination strategies for yeast fermentations. In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020274>
- Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2017). Bacteriophages and its applications: an overview. In *Folia Microbiologica* (Vol. 62, Issue 1, pp. 17–55). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0471-x>
- Silva, J. B., & Sauvageau, D. (2014). Bacteriophages as antimicrobial agents against bacterial contaminants in yeast fermentation processes. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0123-9>

- Silva, S., Oliveira, A. I., Cruz, A., Oliveira, R. F., Almeida, R., & Pinho, C. (2022). Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Portuguese Craft Beers and Raw Materials. *Molecules*, 27(22), 8007. <https://doi.org/10.3390/molecules27228007>
- Simon Sarkadi, L. (2017). Biogenic Amines in Fermented Foods and Health Implications. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 625–651). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00027-3>
- Skaradzińska, A., Ochocka, M., Śliwka, P., Kuźmińska-Bajor, M., Skaradziński, G., Friese, A., Roschanski, N., Murugaiyan, J., & Roesler, U. (2020). Bacteriophage amplification – A comparison of selected methods. *Journal of Virological Methods*, 282, 113856. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113856>
- Stephenson, F. H. (2016). Working with Bacteriophage. In *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology* (pp. 81–96). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802211-5.00004-7>
- Suzuki, K. (2011). 125th Anniversary Review: Microbiological Instability of Beer Caused by Spoilage Bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(2), 131–155. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00454.x>
- Suzuki, K. (2015). Gram-positive spoilage bacteria in brewing. In *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* (pp. 141–173). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00007-1>
- Świder, O., Roszko, M. Ł., & Wójcicki, M. (2023). The inhibitory effects of plant additives on biogenic amine formation in fermented foods – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–26. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2258964>
- Tovkach, F. I., Zhuminska, G. I., Kushkina, A. I., & Zabolotny, D. K. (2012). LONG-TERM PRESERVATION OF UNSTABLE BACTERIOPHAGES OF ENTEROBACTERIA. *Біологія*, 74(2).
- Tse, T. J., Wiens, D. J., & Reaney, M. J. T. (2021). Production of Bioethanol—A Review of Factors Affecting Ethanol Yield. *Fermentation*, 7(4), 268. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040268>
- Visciano, P., & Schirone, M. (2022). Update on Biogenic Amines in Fermented and Non-Fermented Beverages. In *Foods* (Vol. 11, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods11030353>
- Wagner, N., Brinks, E., Samtlebe, M., Hinrichs, J., Atamer, Z., Kot, W., Franz, C. M. A. P., Neve, H., & Heller, K. J. (2017). Whey powders are a rich source and

- excellent storage matrix for dairy bacteriophages. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.037>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Watanabe, K., & Takesue, S. (1972). The Requirement for Calcium in Infection with Lactobacillus Phage. *Journal of General Virology*, 17(1), 19–30. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-17-1-19>
- Wohlfarth, J. C., Feldmüller, M., Schneller, A., Kilcher, S., Burkolter, M., Meile, S., Pilhofer, M., Schuppler, M., & Loessner, M. J. (2023). L-form conversion in Gram-positive bacteria enables escape from phage infection. *Nature Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01317-3>
- Wójcik, W., Łukasiewicz, M., & Puppel, K. (2021). Biogenic amines: formation, action and toxicity – a review. In *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Vol. 101, Issue 7, pp. 2634–2640). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10928>
- Worley-Morse, T. O., Deshusses, M. A., & Gunsch, C. K. (2015). Reduction of Invasive Bacteria in Ethanol Fermentations Using Bacteriophages. *Biotechnol. Bioeng*, 112, 1544–1553. <https://doi.org/10.1002/bit.25586/abstract>
- Wunderlich, S., & Back, W. (2009). Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. In *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 3–16). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00001-8>
- Xiao, Y., Huang, P., Huang, Z., Yu, K., Song, Y., Guo, N., Dai, H., Jiang, M., Xu, Y., Wang, D., & Wei, Q. (2022). Influencing factors on the preservation of lytic bacteriophage VP3. *Biosafety and Health*, 4(5), 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2022.06.004>
- Yang, Z., Li, W., Yuan, Y., Liang, Z., Yan, Y., Chen, Y., Ni, L., & Lv, X. (2023). Metagenomic Insights into the Regulatory Effects of Microbial Community on the Formation of Biogenic Amines and Volatile Flavor Components during the Brewing of Hongqu Rice Wine. *Foods*, 12(16), 3075. <https://doi.org/10.3390/foods12163075>
- 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.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.1256>

Zhao, Y., Knøchel, S., & Siegumfeldt, H. (2017). Heterogeneity between and within Strains of *Lactobacillus brevis* Exposed to Beer Compounds. *Frontiers in Microbiology*, 08. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00239>

Zuljan, F. A., Mortera, P., Alarcón, S. H., Blancato, V. S., Espariz, M., & Magni, C. (2016). Lactic acid bacteria decarboxylation reactions in cheese. In *International Dairy Journal* (Vol. 62, pp. 53–62). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.07.007>