

Los virus de las bacterias lácticas: influencia sobre la fabricación de alimentos fermentados

(no hay enemigo pequeño)

Ana Rodríguez¹, Carmen Madera² y Juan Evaristo Suárez^{1,3}

¹ Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC), Villaviciosa, Asturias. ² Corporación Alimentaria Peñasanta S. A. (CAPSA), Granda, Siero, Asturias. ³ Área de Microbiología, Universidad de Oviedo. e-mail: evaristo@uniovi.es.

Las fermentaciones alimentarias dependen del crecimiento y la actividad de las bacterias del ácido láctico, los componentes universales de los fermentos o cultivos iniciadores, que utilizan los azúcares de los productos agropecuarios para producir ácido láctico y obtener la energía que necesitan para sus procesos vitales. El ácido láctico y otras sustancias minoritarias como el diacetilo, el acetaldehído y el agua oxigenada, que se acumulan durante la fermentación, protegen al producto final frente a la contaminación por bacterias y hongos indeseables, depurándolo y preservándolo de la alteración prematura. Estas sustancias y otras procedentes de la utilización de las proteínas y grasas de la materia prima, van a dar el sabor y la textura característicos a los derivados lácteos, los embutidos, los vegetales fermentados y hasta al vino y a la sidra.

Ahora bien, el crecimiento de las bacterias de los fermentos y, por ende, su capacidad de transformación de la materia prima, puede verse inhibido por múltiples causas, como la presencia de restos de antibióticos en la materia prima, de desinfectantes procedentes de la limpieza de las cubas y tuberías, de agentes inhibidores naturales como el sistema de la lactoperoxidasa de la leche, etc.

Los fagos: planteamiento general del problema. Aunque ciertamente las causas citadas tienen influencia negativa sobre la buena marcha de las fermentaciones comerciales, el mayor problema se deriva de la infección de las células del fermento por bacteriofagos.

Los bacteriofagos (o abreviadamente fagos) son los virus de las bacterias. Al igual que ocurre con los que infectan plantas o animales, son organismos parásitos cuyo desarrollo provoca la muerte de las células sensibles (Fig 1). El proceso es muy rápido,



Figura 1.- Aspecto de un cultivo de *Lactobacillus casei* infectado por el bacteriofago A2 en medio sólido. La bacteria cubre toda la superficie, excepto los puntos en que había un fago. El desarrollo de sucesivas generaciones del virus ha impedido el crecimiento de las células hospedadoras, lo que se observa como zonas circulares libres de bacterias, denominadas calvas o placas de lisis.

habitualmente en tan solo 45 a 60 minutos dan lugar a una progenie de unos 200 individuos por célula infectada, cada uno de los cuales puede atacar a otra célula y propagar así la infección hasta que todo el cultivo resulta destruido. Es fácil imaginar el efecto terrible de los fagos cuando infectan un cultivo iniciador al comienzo del proceso de fermentación, las células se van muriendo a velocidad progresivamente creciente y el producto final queda insuficientemente procesado, presentando defectos de textura, de sabor y hasta de seguridad para el consumo (Fig. 2).

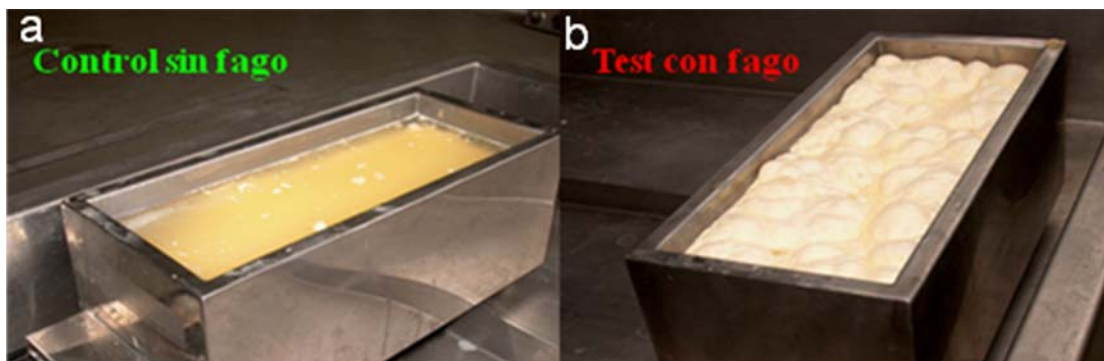


Figura 2.- Aspecto de cuajadas obtenidas tras la fermentación de leche por un cultivo iniciador de *Lactococcus lactis* (a) y de la misma bacteria más un fago que se propaga sobre ella (b). Obsérvese que en el primer caso el suero sobrenada el coágulo (como debe de ser) mientras que en el segundo la insuficiente generación de ácido láctico debida a la infección, no ha permitido la separación de las dos fases y que se han producido burbujas de gas, originadas tras la fermentación de la lactosa por microorganismos contaminantes, que han quedado atrapadas en la masa.

El problema es especialmente grave en los ambientes lácteos, ya que la materia prima y el subproducto más abundante, el suero, son fluidos que forman aerosoles con facilidad, de forma que los fagos van incluidos en las microgotas y pueden contaminar así el

ambiente de toda la factoría. Como indicaciones de la seriedad del problema tenemos: a) que la infección fágica ya se detectó en 1935, es decir en los albores del uso generalizado de fermentos comerciales, b) que ha condicionado tanto el diseño de las factorías como de los sistemas de producción, c) que actualmente en la elección de las bacterias componentes de un cultivo iniciador es tan importante que sean resistentes a la infección por bacteriofagos como que fermenten eficazmente la lactosa y d) que a pesar de todas estas precauciones el problema aún no se ha solucionado.

Las bacterias más comúnmente empleadas en los fermentos lácteos son los lactococos (*Lactococcus lactis*) que es el iniciador mesófilo universal para la fabricación de queso, los leuconostocs (*Leuconostoc lactis*) que frecuentemente acompañan al anterior en iniciadores aromatizantes y la combinación *Streptococcus thermophilus* – *Lactobacillus delbrueckii*, que se usa en la fabricación del yogur y de los quesos de pasta cocida. En los últimos años, el abanico se ha ampliado a los lactobacilos mesófilos y a las bifidobacterias, que se incluyen bien como probióticos o bien como adjuntos al fermento para la maduración y afinado de los quesos. (Mesófilo significa que ama las temperaturas moderadas, entre 20 y 30°C).

Aunque todas estas bacterias son susceptibles al ataque por fagos (Fig. 3) las características de las infecciones que afectan a los lactococos son las más conocidas tanto por razones históricas como por la magnitud del uso de los fermentos mesófilos. Así por ejemplo, se han descrito diez tipos de fagos capaces de infectar a distintas cepas de esta bacteria (el término cepa se usa en Microbiología como sinónimo de raza o estirpe). De entre ellos tres, denominados 936, c2 y P335, son responsables de la inmensa mayoría de los incidentes industriales, siendo 936 el más frecuente, seguido de c2 y, finalmente, P335. Los fagos de este último grupo se denominan atemperados porque poseen la peculiaridad de poder establecerse dentro de las células del fermento en un estado “durmiente” y transmitirse así a las células hijas. El peligro estriba en que pueden “despertarse”, provocar la muerte de la célula que los alberga y, lo que es peor, dar lugar a fagos activos capaces de propagar la infección a todo el cultivo iniciador.

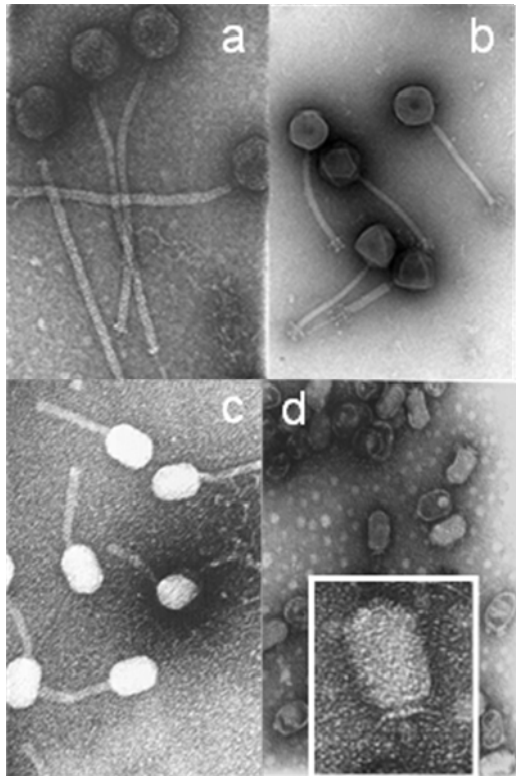


Figura 3.- Morfología de varios bacteriófagos que infectan bacterias lácticas: a) Fago A2 de *Lactobacillus casei* (obsérvese que presenta una cabezuela en la que guarda su genoma y una cola larga que utiliza para reconocer a las células sensibles); b) LP65 de *Lactobacillus johnsonii* (en este caso la cola es contráctil, véase el fago de abajo y funciona como una jeringuilla para atravesar la pared y la membrana de la célula sensible e inyectar su DNA en el citoplasma de la célula hospedadora); c) fago c2 de *Lactococcus lactis* (uno de los que causa mayores pérdidas económicas) y d) P434 también de *Lactococcus lactis* (la cola es muy corta). La foto de LP65 nos fue amablemente cedida por Harald Brussow, que trabaja en la compañía Nestle en Lausanne, Suiza. La longitud de todos estos fagos está entre 100 y 200 nanómetros. Para dar una idea mejor de su tamaño, podríamos decir que en un milímetro cabrían entre 5.000 y 10.000 fagos alineados.

La defensa frente a la infección fágica se articula en torno a tres procedimientos complementarios: a) prevención del acceso de los fagos a la masa en fermentación, b) saneamiento de las instalaciones para eliminar los fagos del ambiente y c) desarrollo de fermentos resistentes a la infección viral.

a) Prevención de la contaminación: Incluye estrategias de propagación aséptica de las bacterias del fermento utilizando, además, medios con altas concentraciones de fosfatos y citratos, los cuales adsorben iones magnesio y calcio, que son esenciales para la estabilidad e infectividad de los fagos. Complementariamente, se recurre al uso de cubas herméticamente cerradas, instaladas en ambientes con sobrepresión para evitar la entrada de aire contaminado en las salas de fermentación, a la inoculación directa del fermento, al desuerado cuidadoso para evitar la formación de aerosoles y además, se promueve la circulación del aire desde la zona de procesamiento inicial de la leche hacia la de manipulación de la cuajada. De este modo se controla bastante bien la contaminación intrafactoría.

b) Limpieza y desinfección de las instalaciones: La depuración de la factoría para eliminar fagos del ambiente, material, tuberías, etc., puede hacerse de muchas maneras, desde el uso de desinfectantes hasta la instalación de tubos de luz ultravioleta en las salas de fabricación. Dentro de los primeros, tenemos el ácido peracético y el

hipoclorito como agentes más usuales, aunque también pueden usarse otros como el etanol al 70%, los compuestos de amonio cuaternario, etc. Ahora bien, la utilización de cualquiera de estos procedimientos conlleva dos riesgos: a) es necesario eliminar completamente los desinfectantes una vez que han actuado, porque las bacterias lácticas son extremadamente sensibles a ellos y los restos, incluso muy diluidos, pueden inhibir la fermentación subsiguiente y b) los fagos, al comportarse como partículas inertes cuando están fuera de las células, son bastante resistentes a estos tratamientos, por lo que siempre existe el peligro de dejar fagos viables en zonas de difícil acceso como rincones, codos, llaves, etc., que podrían actuar como semillero en los procesos posteriores de fabricación.

c) Utilización de iniciadores resistentes: El uso continuado de fermentos lácticos, junto a la casi universal tendencia a adquirirlos a compañías especializadas en su propagación y distribución, ha permitido ir aislando cepas de lactococos resistentes a la infección por fagos concretos. Desgraciadamente, los fagos, como seres vivos que son, reaccionan frente a estas defensas celulares ideando nuevos mecanismos de infección, en un proceso infinito de acción – reacción que previsiblemente nos obligará a mantenernos alerta de forma continuada. Ahora bien, ¿en qué se basa esta resistencia natural que han desarrollado algunos lactococos?. Fundamentalmente en la interferencia con el ciclo de propagación de los virus, lo que se articula en los siguientes mecanismos: a) bloqueo de la entrada del fago en la célula y b) inhibición del desarrollo intracelular del virus.

Antes de entrar en la descripción del primer sistema necesitamos saber que las bacterias, al igual que las demás células, poseen una membrana que les confiere su identidad como tales y las comunica con el ambiente. Por fuera de la membrana tienen una capa rígida que las envuelve, a la que denominamos pared celular. Los fagos se unen específicamente a determinados componentes de la pared y la membrana, como paso inicial de la infección. Por tanto, una célula puede hacerse resistente si, por una mutación, pierde la capacidad de fabricar los componentes superficiales que reconoce un fago concreto o bien es capaz de esconderlos, por ejemplo segregando una cápsula, es decir una capa externa a la pared (lo que además puede ser beneficioso, porque habitualmente tienen consistencia mucosa y confieren untuosidad a los productos descremados como los yogures y los quesos frescos de untar o del tipo petit-suisse, haciéndolos más agradables al paladar).

En otras ocasiones, el fago penetra normalmente en la célula pero, una vez dentro, su ADN es cortado en múltiples trozos por proteínas especiales que fabrica la bacteria (denominados enzimas de restricción), lo que, naturalmente, lo mata. En algunos otros casos, la bacteria detecta la presencia del fago en su interior y se suicida antes de que el virus sea capaz de producir descendencia, abortando así la propagación de la infección a otras células del fermento.

Los genes bacterianos que confieren resistencia frente a la infección viral se localizan, habitualmente, en plásmidos. Los plásmidos son moléculas de ADN que se comportan como auxiliares del genoma de la bacteria, dotándola de propiedades de interés como ésta de resistir al ataque viral. Es frecuente que un plásmido albergue varios sistemas de resistencia los cuales, en ocasiones, actúan sinérgicamente potenciando así sus efectos respectivos.

La buena noticia es que algunos de estos plásmidos emigran de unas células a otras, es decir, que en el caso que nos ocupa convierten a las bacterias receptoras, que previamente eran sensibles a la infección, en resistentes. Este proceso, denominado conjugación, ha sido usado frecuentemente en la mejora de cepas industriales, hasta el punto de que probablemente todos los lactococos incluidos en fermentos hoy en día poseen plásmidos de resistencia a bacteriofagos.

Ahora bien, como ya se dijo, existe una relación dinámica por la cual los fagos evolucionan para contrarrestar los sistemas de defensa desarrollados por las bacterias de los cultivos iniciadores. Por ello, pasado un tiempo de utilización de un fermento, es habitual que aparezcan problemas asociados a la infección por fagos, que se han adaptado a las nuevas condiciones del cultivo. Para minimizar esta situación en lo posible, se recurre a la rotación de los cultivos mediante el uso sucesivo de distintos fermentos. Con esta práctica se pretende evitar que cualquier cepa pueda estar en contacto con los fagos del ambiente de la factoría el tiempo suficiente para que puedan adaptarse a ella e infectarla con éxito.

Origen de la contaminación viral. Los procedimientos de defensa frente a la infección fágica a que hemos aludido hasta aquí tratan de impedir que los fagos establecidos en las factorías afecten al proceso de fabricación. Ahora bien, debería ser posible plantear una segunda estrategia, en este caso de tipo preventivo, mediante la cual se intentaría evitar la invasión de las instalaciones. Previamente al diseño de una estrategia de este tipo habría que preguntarse cuál es el origen de los fagos que infestan los ambientes lácteos. Dada la especificidad de la relación fago-bacteria láctica, los orígenes posibles

se reducen a dos: a) la leche de partida, que siempre está contaminada con algunas bacterias, a expensas de las cuales podrían haberse desarrollado los virus y b) los fermentos que se le añaden para promover su transformación a producto final. Sorprendentemente, detectamos una falta de datos casi total sobre el origen último de los fagos lácticos, razón por la cual emprendimos un trabajo en colaboración con el Laboratorio Interprofesional Lechero de Asturias (LILA), para intentar arrojar alguna luz sobre el tema. En dicho trabajo se analizaron unas mil muestras de leche procedentes de ganaderos de toda Asturias. De ellas casi el 10% estaban contaminadas con fagos de lactococos, siendo los del tipo c2 los más abundantes. Complementariamente, se investigaron 24 cuajadas (y sus correspondientes sueros) originadas en otras tantas queserías artesanales. En este caso detectamos niveles considerables de fagos en todas las fabricaciones aunque, para nuestra sorpresa, los más abundantes eran del tipo 936.

Al intentar determinar porqué se producía el cambio de los fagos prevalentes, desde c2 en la leche hasta 936 en el suero, encontramos que éstos últimos resistían el tratamiento de pasteurización a que se somete la leche antes de inducir el cuajado, mientras los fagos c2 se inactivaban casi completamente durante este tratamiento térmico (71°C durante 15 segundos o 62°C por media hora). En todo caso, comprobamos que elevando la temperatura de pasteurización hasta 80°C durante 5 minutos, se inactivaban incluso los fagos tipo 936, lo que puede ser una buena estrategia de eliminación de la contaminación de la leche (siempre que los usos posteriores de la misma sean compatibles con este tratamiento). También encontramos que los fagos del grupo P335, que no se detectaban en la leche, aparecían, aunque con baja frecuencia, en los sueros, probablemente como consecuencia de la inducción de los fagos durmientes que albergan las bacterias de los fermentos utilizados.

Para responder a la segunda posibilidad, los fagos llegan a la factoría incluidos en los propios cultivos iniciadores, analizamos una serie de fermentos comerciales de diferentes suministradores. Ninguno de ellos incluía fagos capaces de propagarse en los lactococos que se usan habitualmente para detectarlos. Sin embargo, sí que era posible inducir la liberación de los fagos durmientes, aunque la eficiencia de este proceso era muy baja y requería de la aplicación de tratamientos inductores drásticos. Todo esto indica, a nuestro juicio, que los fermentos no son una fuente significativa de nuevos fagos, sino que ésta ha de buscarse en la leche que se utiliza como materia prima de partida.

A la vista de lo escrito en este artículo, pudiera parecer que el problema de la infección fágica seguirá comprometiendo indefinidamente la buena marcha de las fermentaciones lácteas, a pesar del enorme avance que se ha producido tanto en el conocimiento de los fagos de las bacterias del ácido láctico como en el diseño de cepas y condiciones que intentan paliarlo. Sin embargo, el camino recorrido en la dirección de impedir el acceso de los fagos a la leche y, si éste se produce, de minimizar sus efectos ha sido muy grande. De cara al futuro, hay puestas muchas esperanzas en el uso de nuevas tecnologías, como la manipulación genética, que permitirán conocer mejor la relación de los fagos con sus hospedadores y aplicar nuevas herramientas para el desarrollo de cepas y estrategias de cultivo, cuya puesta en valor contribuirá previsiblemente a controlar mejor el problema de la infección de los iniciadores y, así, a aumentar la competitividad de las empresas europeas del ramo mediante la generación de alimentos aseguibles, de calidad contrastada y uniforme y, lo que es más importante, saludables y sabrosos.