

UNIVERSIDAD DE CORDOBA



"VIGILADA MINEDUCACIÓN"

**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA**

**IMPORTANCIA Y APLICACIÓN DE BACTERIOFAGOS LITICOS EN LA
INDUSTRIA ALIMENTARIA**

NELLY MORILLO

Trabajo de grado para obtener título de Bacterióloga

**LINDA MARIA CHAMS CHAMS M.Sc
Director(a)**

**MONTERÍA
2020**

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Jehová mi Dios por haberme permitido llegar hasta aquí y ser quien soy.

A mi madre Marleny por su lucha, sacrificio y gran amor.

A mi Segunda madre Delmira Arrieta por ser mi hombro, mi refugio y por sus palabras de aliento en todo momento.

A mi padre Jeronimo por creer en mí desde la distancia.

A mi Tía Mirtha por estar siempre conmigo pese a las adversidades.

A mi directora la Dr Linda Chams por su apoyo, paciencia y dedicación.

A todos mis profesores por su enseñanza y entrega; especialmente al profesor E. Manuel Alvis por sus sabios consejos y su gran motivación, y al profesor Gustavo Quintero por su apoyo infinito.

A mi Gemelo y mejor amigo Felipe Bustamante por su cariño y su buena vibra, sin lugar a dudas fueron indispensables en el proceso.

A Dina Ramos hermana y amiga por no permitirme desistir, por creer siempre en mí y por su amistad incondicional.

Y a mis demás amigos y amigas por su comprensión en esos momentos en los que no tuve tiempo ni para saludarles y quienes me motivaron y estuvieron dispuestos a colaborar (Ricardo, Maria Leo, Mery, Leidy).

TABLA DE CONTENIDO

1. PRESENTACIÓN.....	4
2. INTRODUCCIÓN	5
3. TEMÁTICA	10
3.1 BACTERIÓFAGOS	10
3.1.1 Definición	10
3.1.2 Características	12
3.2 APLICACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.....	15
3.2.1 Biocontrol	16
3.2.2 Desinfectantes	20
3.2.3 Conservación.....	22
3.2.4 Coctel de fagos.....	23
3.3 ASOCIACIÓN CON OTROS MATERIALES /MÉTODOS.....	25
4. CONCLUSIÓN.....	28
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1. PRESENTACIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos, son un problema de Salud Pública, donde las bacterias patógenas juegan un rol trascendental. La industria alimentaria ha implementado diversas estrategias de control para enfrentar esta situación, es así como en los últimos años esta industria viene desarrollando herramientas biotecnológicas, entre las que está la aplicación de bacteriófagos directamente en los alimentos, para evitar su contaminación con bacterias patógenas y deterioradoras.

Las propiedades bactericidas de los fagos y su inocuidad para el hombre y los animales los han convertido en una alternativa segura para la industria alimenticia en el mercado internacional. De esta manera, se logrará obtener la máxima actividad reductora de la carga bacteriana, generando así un alimento más seguro. Esta revisión aborda ciertos factores a considerar para el uso de bacteriófagos como agentes bio-controladores de patógenos alimentarios, incluyendo: definición, características, aplicación en la industria alimentaria entre otros.

2. INTRODUCCIÓN

Desde siempre la inocuidad alimentaria ha sido la mayor preocupación y el eje central de todas las empresas dedicadas al procesamiento y producción de alimentos, esto está directamente relacionado con el riesgo de producir una Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETAs). Las ETAs, siguen siendo un problema de Salud Pública a nivel mundial; según la OMS cada año en la región de las Américas, 77 millones de personas se enferman y más de 9000 mueren, de los cuales más de 2000 son menores de cinco años, siendo las bacterias responsables del mayor número de casos. Organización Mundial de la salud (OMS, 2015)

Las bacterias como la *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp y *Escherichia coli enterohemorrágica* (ECEH), *Shigella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* spp, *Clostridium* spp y *Staphylococcus aureus*, figuran como los patógenos más comunes productores de ETAs. Estos microorganismos patógenos afectan anualmente a millones de personas algunas veces con consecuencias graves o mortales (OMS, 2020). Es importante aclarar que las bacterias patógenas aunque estén presentes en el alimento o estén sus toxinas, estas rara vez afectan las características organolépticas de los alimentos, hecho que las convierte en un verdadero peligro para la salud del consumidor.

Los alimentos que están más relacionados con la transmisión de estos patógenos son leche no pasteurizada, carne de ave cruda o poco cocida, carne bovina poco cocida, frutas y hortalizas frescas. En los últimos diez años se han registrado brotes de enfermedades graves transmitidas por los alimentos en todos los continentes, a menudo amplificadas por la globalización del comercio, un ejemplo es la contaminación de carne lista para consumo con *Listeria monocytogenes* en Sudáfrica en 2017-2018, con 1060 casos de listeriosis y 216 muertes (OMS, 2020).

A diferencia de las bacterias patógenas que causan ETAs, existe un grupo de bacterias que están catalogadas en la industria de alimentos como deterioradores, que afectan las características organolépticas del alimento relacionadas con la apariencia, aroma, sabor, olor y textura, hecho que muchas veces causa grandes pérdidas económicas a las empresas de alimentos, las cuales tienen que retirar del mercado los lotes alterados que han sido rechazados por los consumidores. En este grupo de microorganismos encontramos a los géneros bacterianos: *Serratia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Micobacterium*, *Bacillus* (Ramírez, 2005).

Actualmente existen muchos tratamientos para el control y eliminación de bacterias patógenas, entre los que están el uso de desinfectantes, aditivos, antimicrobianos, regulación térmica, buenas prácticas de manufacturas, entre otros, sin embargo, son tratamientos con alto costo que además pierden su efectividad debido a su uso indiscriminado, favoreciendo el aumento y desarrollo de muchas resistencias lo que reduce la eficacia de los mismos. Las bacterias que con más frecuencia suelen presentar resistencia son: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytoneges*, *Salmonella* spp, ECEH (O157:H7), *Vibrio* spp, *Clostridium* spp. (Chylkova, Cadena, Ferreiro, & Pitesky, 2017).

Por otro lado, la mayoría de estas bacterias tienen la capacidad de formar biofilms, que consiste en la adhesión de una comunidad de bacterias a una superficie sólida, siendo esta más difícil de tratar. Varios estudios han demostrado que una variedad de desinfectantes de uso industrial, no son capaces de erradicar completamente a los patógenos en este estado (Chaitiemwong, Hazeleger y Beumer, 2014; Chylkova, Cadena, Ferreiro y Pitesky, 2017; Fagerlund, Langsrud, Heir, Mikkelsen y Møretro, 2016; Martin *et al.*, 2016).

Así mismo en un estudio sobre la tolerancia de biopelículas de *Clostridium perfringens* a cinco desinfectantes: monopersulfato de potasio, solución de glutaraldehído, cloruro de amonio cuaternario, peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio, demostró que los biofilms de *Clostridium* tuvieron la capacidad de proteger a las células bacterianas frente a cuatro de los desinfectantes exceptuando al hipoclorito de sodio.(Charlebois, Jacques, Boulianne, & Archambault, 2016).

También es necesario mencionar que el aumento de la creciente demanda por parte de la población para consumir productos listos procesados, mínimamente procesados o totalmente frescos, representan una amenaza que puede favorecer el incremento de las ETAs; es por ello que la industria alimentaria trabaja por la búsqueda de nuevas alternativas que controlen la multiplicación y presencia de estos patógenos en los alimentos sin que ello influya en sus características organolépticas (como sucede con algunos antimicrobianos y desinfectantes), aumento de resistencia y que sean seguros para los humanos y amigable con el medio ambiente (Goodridge y Bisha, 2011).

Cumpliendo con todas estas características y con una amplia gama de beneficios se encuentra el uso de bacteriófagos. Considerada una técnica verde y método natural donde se aplican bacteriófagos líticos aislados del medio ambiente para apuntar específicamente a bacterias patógenas logrando eliminarlas o reduciendo significativamente la carga de estos microorganismos en los alimentos (Wójcik *et al.*, 2020).

Desde la concepción inicial del uso de bacteriófagos en los alimentos, un número considerable de investigaciones han descrito la aplicación de estos como agentes de Biocontrol, para atacar una variedad de patógenos o deterioradores bacterianos, que va desde carnes frías hasta frutas y verduras frescas listas para el consumo(Moye, Woolston, & Sulakvelidze, 2018). Aunque los bacteriófagos fueron descubiertos hace algunos años, prometen ser los mejores antimicrobianos naturales; superando los resultados y las limitaciones

de los métodos convencionales, así lo respaldan muchos estudios realizados hasta la fecha (Anany *et al.*, 2014 ; Goodridge y Bisha, 2011 ; Hagens y Loessner, 2010 ; Moye *et al.*, 2018 ; Schmelcher y Loessner, 2014).

Los bacteriófagos o fagos, son las entidades biológicas más abundantes del planeta, además, son capaces de propagarse en cualquier hábitat en el que se encuentre la bacteria hospedadora, (Ackermann y Prangishvili, 2012). Una de la característica más importante y que los hace tan efectivos es su especificidad, ya que poseen una alta capacidad para infectar y matar solo el microorganismo para el cual está codificado su ataque, lo que resulta muy provechoso en la industria alimentaria, debido a que se utilizarían bacteriófagos específicos para la bacteria problema y no se alteraría la microbiota del producto, y por lo tanto no cambia las características organolépticas del alimento. Estudios recientes demuestran la reducción de bacterias con esta técnica, incluso hasta niveles indetectables en diferentes alimentos contaminados (Fernández, L. Rodríguez, A. y Gutiérrez, 2020).

Por ejemplo; en una muestra de abulón infectada con *Vibrio vulnificus* MO6-24 / O, se observó una reducción logarítmica de 2,15 UFC/ml en 6h, luego de ser tratada con el fago VVP001. Así mismo, este estudio demostró la estabilidad del fago a temperaturas de -20°C a 60°C, pudiendo ser utilizado en varias aplicaciones alimentarias , además dada su especificidad se califica como excelente conservante de mariscos crudos contra *Vibrio vulnificus* MO6-24 / O (H.-J. Kim *et al.*, 2020).

Del mismo modo en otro estudio donde se aplicó Listex P100 (producto basado en fagos contra *Listeria monocytogenes*), en un jamón curado en seco contaminado con *Listeria monocytogenes*, se observó una reducción de la contaminación por debajo de los límites de detección (<10 UFC / cm²) después de 24 h a 4 ° C y 12 ° C. lo que evidencia la eficacia de los fagos como bioconservantes (Gutiérrez *et al.*, 2017).

Otra particularidad que debe resaltarse en los fagos es su capacidad de infectar con la misma intensidad a bacterias sensibles y resistentes a antibióticos, lo que actualmente supone uno de los mayores retos en la industria y que dejaría de ser un problema con la implementación de fagos adecuados. (Shahin, Bouzari, Wang, & Yazdi, 2019), demostraron en un estudio la inactivación de una especie de *Shigella* spp multirresistente en varios alimentos mediante la aplicación de los fagos específicos; vB_SfIS-ISF001 y vB_SsoS-ISF002 quienes redujeron significativamente los recuentos bacterianos.

(Moye, Woolston, & Sulakvelidze, 2018b), afirmaron que los bacteriófagos virulentos son candidatos atractivos como antimicrobianos en la industria alimentaria ya que pueden replicarse exponencialmente en bacterias susceptibles, independientemente de su perfil de resistencia a antibióticos.

El control biológico mediante bacteriófago lítico está empezando a ser aceptado como una tecnología limpia para garantizar la seguridad alimentaria, ya que estos abordan muchas de las preocupaciones actuales de los consumidores. Así mismo, como se ha dicho anteriormente, su especificidad hace que únicamente afecten a los microorganismos patógenos y no a la microbiota propia de los alimentos ni a la microbiota del tracto intestinal. Por otro lado son respetuosos con el medioambiente, pues se han aislado de él (Alegre Vilas, Abadias Seró, Colás Medà, Collazo Cordero, & Viñas Almenar, 2020).

La presente revisión tiene como propósito brindar una actualización sobre la importancia y las diferentes aplicaciones que pueden tener los bacteriófagos específicamente los líticos en la industria alimentaria, para el biocontrol sobre diferentes patógenos que comúnmente están involucrados en ETAs. Todo lo descrito en esta Monografía está basado en diferentes experimentos científicos que han demostrado resultados satisfactorios, así mismo se pretende detallar las características más importantes que deben cumplir los bacteriófagos, para poder ser empleados en los diferentes procesos de producción alimentaria.

3. TEMÁTICA

3.1 BACTERIÓFAGOS

3.1.1 Definición

Los bacteriófagos (o fagos) son los virus de las bacterias. Al igual que el resto de los virus, tienen una estructura relativamente simple ya que están formados por proteínas y ácidos nucleicos. Se trata de parásitos intracelulares, es decir, necesitan infectar una célula, en este caso una bacteria, para multiplicarse. Los bacteriófagos solo infectan células procariotas (bacterias y arqueas), mientras que los virus que ocasionan enfermedades en humanos, animales y en plantas, son exclusivos de células eucariotas en las cuales se multiplica (Fernández, L. Rodríguez, A. y Gutiérrez, 2020).

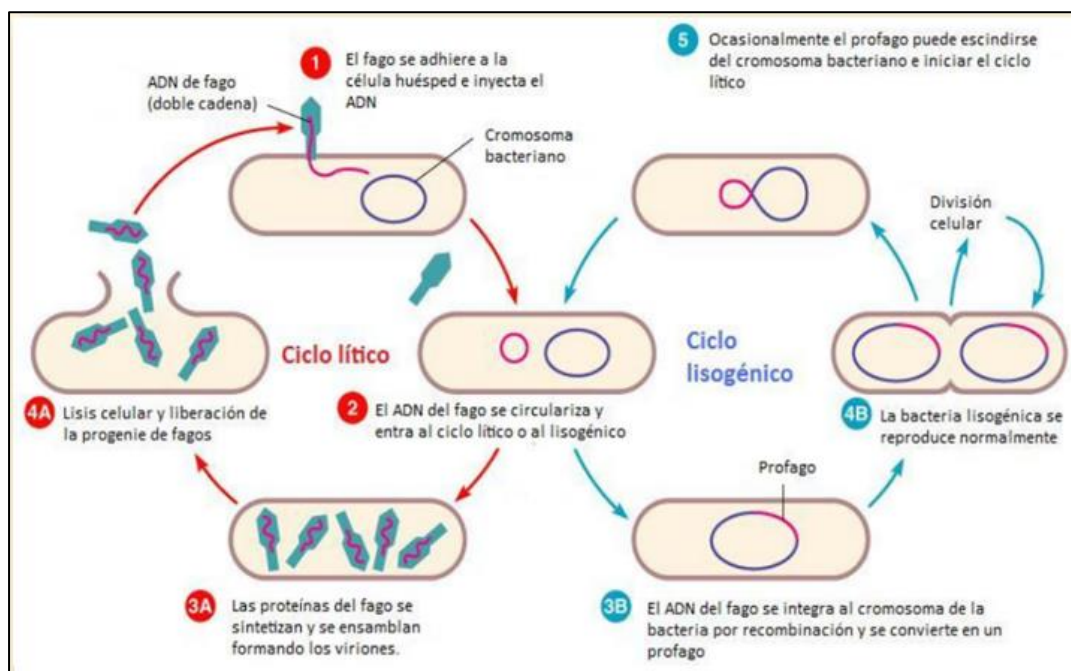


Figura 1. Esquema de los ciclos lítico y lisogénico de los fagos

Tomado de: file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/2-Texto%20del%20art%C3%ADculo-17-1-10-20190118.pdf

Los bacteriófagos pueden clasificarse en líticos (virulentos) o lisogénicos (atemplados) de acuerdo a su ciclo replicativo (Figura 1). Para el caso de los fagos líticos, estos tienen la capacidad de destruir la bacteria una vez se ha producido la progenie viral. Para llegar a ello deben darse los siguientes pasos:

- ✓ Unión del fago a un receptor específico de la bacteria, este proceso es conocido como adsorción, y se da por medio de proteínas o fibras presentes en la cola del fago y la superficie bacteriana.
- ✓ Inyección del genoma, ADN o ARN por medio de la cola en el interior de la bacteria.
- ✓ Replicación del genoma viral en el interior de la célula bacteriana, se da la síntesis y el ensamblaje de nuevas partículas virales.
- ✓ Lisis bacteriana por acción de Endolisinas, de las cual se hablará más adelante.

En el caso de los fagos lisogénicos no ocurre lo mismo, aquí el genoma viral se inserta en el cromosoma bacteriano (recibiendo el nombre de profago), y se replica con el de la bacteria, pasando de generación en generación sin destruir a la célula, en este ciclo la bacteria presenta inmunidad temporal al fago mientras este se encuentre en su interior, sin embargo el fago puede pasar al ciclo lítico bajo algunas señales que permitan su activación, destruyendo así a la bacteria (Jorquera, Galarce, & Borie, 2015a).

De acuerdo a lo anterior el uso de fagos lisogénicos no es recomendable ni como agentes terapéuticos ni como bio-controladores en alimentos, pues en algunos casos pueden portar genes que codifiquen para factores de virulencia o de resistencia a antimicrobianos (Jorquera, Galarce, & Borie, 2015b). Es por ello que solo deben usarse fagos líticos que garantizan la muerte instantánea de la bacterias y en los cuales hasta el momento no se ha evidenciado que transfieran factores de virulencia, como lo demostraron Carlton, Noordman, Biswas, De Meester y Loessner (2005), en un estudio realizado en el bacteriófago P100, que es específico para *Listeria* spp, donde no se encontró ninguna similitud de toxina ni factores de virulencia asociados a la patogenia de la misma así como también se descartó la peligrosidad de alguna de sus partículas para la salud humana.

3.1.2 Características

Como es de esperarse los fagos al igual que el resto de los virus tienen una composición simple, están formados por material genético sea ADN o ARN, el cual se encuentra protegido por una envoltura compuesta por proteínas, conocida como cápside (Harada *et al.*, 2018) . Muchos poseen cola, y más del 96% de los bacteriófagos pertenecen al orden *Caudovirales* con una cápside icosaédrica que contiene ADN bicatenario y una cola; donde puede encontrarse la placa basal que corresponde a la región que hará contacto con la bacteria en el momento de la infección (Sharma *et al.*, 2017). Presentan un tamaño variable de 20-200 nanómetros, por ende solo pueden verse a través de microscopio electrónico; no respiran, y son inmóviles (Hernández, Jiménez & Pla, 2004).

Además de lo ya mencionado los fagos líticos presentan una serie de características que los clasifica como seguros y que los pone por encima de los métodos y herramientas utilizadas normalmente en la producción de alimentos inocuos, estas son:

- ✓ **Alta especificidad;** tal como se comentaba anteriormente, gracias a las proteínas, fibras o espículas presentes en el extremo de la cola de los fagos, estos pueden unirse a receptores específicos de la bacteria hospedadora,(H. Kim, Kim, Kim, Choi, & Lee, 2020), sugieren que estas proteínas son las responsables del reconocimiento y la especificidad del hospedador.

Por otro lado la conexión establecida entre la bacteria y el fago es tan específica que este no es capaz de unirse a otra bacteria aunque pertenezca al mismo género si esta no corresponde a la especie que infecta o no presenta los receptores específicos, lo que garantiza que solamente atacará a la bacteria deseada. Al poseer esta especificidad, los fagos son inofensivos para las plantas, los animales y los seres humanos; de igual manera no afectan el microbioma existente en el

consumidor, los alimentos y el ambiente, ni alteraran las propiedades de los alimentos (Harada *et al.*, 2018). Este hecho es muy importante ya que, en la mayoría de las ocasiones, no es deseable la eliminación del resto de bacterias que acompañan a la bacteria patógena (Fernandez *et al.*, 2020).

- ✓ **Producción de proteínas líticas:** los fagos producen dos enzimas conocidas como Holina y Endolisina, las cuales participan en la etapa final del ciclo lítico. Para el caso de la Holina, esta tiene afinidad por la membrana bacteriana, en la cual se inserta y forma poros por donde saldrá la endolisina al espacio periplásmico; que tiene como función la degradación de peptidoglicano de la pared celular, lo que finalmente ocasionará la lisis bacteriana por aumento de la presión osmótica interna, seguida de la liberación de nuevos viriones (Fernández, Llamas, González, & Suárez, 2020). Un estudio reciente demostró la eficacia de la endolisina LysWL59 en el control de *Salmonella typhimurium* en lechuga, con una actividad lítica superior a las registradas anteriormente con otras Endolisinas (Liu *et al.*, 2019). También logró demostrar una sinergia de la endolisina LysWL59 cuando ésta fue combinada con 0.5 mmol / L de EDTA dando como resultado una disminución del 93.03% *S. typhimurium* en una hora, lo que resulta realmente sorprendente y reafirma el potencial los bacteriófagos en el control de patógenos y deterioradores alimentarios.
- ✓ **Actividad frente a las bacterias resistentes a antibióticos:** numerosos estudios han respaldado esta característica; tanto bacteriófagos como Endolisinas son igualmente efectivos frente a bacterias sensibles y resistentes a los antibióticos (Fernández *et al.*, 2020). Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Shahin et al., (2019) donde se utilizaron dos fagos específicos: vB_SfIS-ISF001 y vB_SsoS-ISF002 frente 19 aislados de *Shigella* spp, resistente a 16 antibióticos, estos bacteriófagos redujeron significativamente los recuentos bacterianos (78,9%) lisando 15 de los 19 aislados de *Shigella*

spp en alimentos contaminados. Sin duda alguna los fagos constituyen un prometedor sistema de eliminación de bacterias resistentes a antibióticos que puedan estar presentes en el entorno alimentario (Wernicki, Nowaczek, & Urban-Chmiel, 2017).

- ✓ **Amigables con el medio ambiente:** los bacteriófagos son tomados del ambiente y por ello representan una herramienta ecológica, dado a que no producen toxicidad ni daños en animales o plantas. Además no se ha logrado demostrar que sus componentes o mezclas generen algún impacto negativo en el ambiente ni en los equipos de procesamiento; caso contrario ocurre con los diferentes desinfectantes químicos, plaguicidas entre otros, que por su naturaleza corrosiva deterioran mucho los equipos, superficies y producen efectos nocivos en el medio ambiente. Por otra parte como se ha afirmado antes, el uso de fagos no genera residuos ni alteraciones en las características de los alimentos, particularidad que se busca en todos los productos empleados en la industria alimentaria.
- ✓ **Autoreplicación / autolimitación:** La rápida producción y aumento de fagos luego de la infección garantiza la reducción o eliminación de la bacteria; gracias a su capacidad de auto-replicación que implica un aumento exponencial en su número tras un proceso de infección, multiplicándose así también su eficacia, así mismo la reducción o escaso número de bacterias produce su inactivación (Gutiérrez, Fernández, Rodríguez & García, 2020).
- ✓ **Acción sobre Biofilms:** Los fagos han mostrado ser muy eficaces en la inhibición, reducción y eliminación de biofilms en diferentes superficies como lo indicaron Gong y Jiang (2017), los cuales emplearon una mezcla de fagos sobre un biofilm de *Salmonella* spp en acero inoxidable (muy utilizado en las plantas de procesamiento), el cual se redujo en un 65,9%. Hay que señalar que bacterias patógenas como

Salmonella spp, pueden persistir en las superficies de los equipos y en el entorno de procesamiento de alimentos durante mucho tiempo y transferirse a los productos alimenticios al entrar en contacto. Los mismos investigadores evaluaron la inhibición de la formación de biofilms, donde se obtuvieron inhibiciones de hasta un 90,0%.

Es importante agregar que los fagos no solo eliminan biofilms formados por una cepa sino que también pueden degradar aquellos producidos por cepas mixtas, los cuales resultan más resistentes y difíciles de penetrar por agentes antimicrobianos. Las características mencionadas anteriormente no solo resaltan al uso de fagos como una alternativa eficaz, sino tan bien como una herramienta completa (Abedon, García, Mullany, & Aminov, 2017).

3.2 APLICACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La incesante búsqueda de alternativas que garanticen la inocuidad alimentaria pone a prueba los sistemas biológicos y con ello da una gran oportunidad al uso de fagos en las diferentes áreas y procesos, que sin lugar a dudas han respondido positivamente al control de patógenos involucrados en ETAs. (Moye, Woolston, & Sulakvelidze, 2018a),

Actualmente se encuentran disponibles muchos productos comerciales a base de fagos que han sido aprobados en un número creciente de países. Estos productos se pueden utilizar para abordar la contaminación por patógenos bacterianos específicos en las diferentes etapas de producción del alimento, incluida la pulverización sobre los productos, la aplicación a los animales antes del procesamiento, la desinfección de las superficies de contacto en las instalaciones de procesamiento (Moye et al., 2018b), incluso para la detección de contaminación bacteriana en productos finales y listos para el consumo.

A continuación se detallaran los diferentes usos y aplicaciones de los fagos en la industria alimentaria mediante los resultados hallados en estudios recientes.

3.2.1 Biocontrol

Como se ha anotado en párrafos anteriores, los fagos disponen de una potente capacidad para reducir las poblaciones de bacterias en diferentes matrices alimentarias. Por ejemplo Young Thung *et al.* (2019), aislaron un bacteriófago lítico STo2 contra *Salmonella typhimurium*, el cual redujo la población bacteriana en 2.2, 2.0 y 2.3 ciclos logarítmicos ($P < 0.01$) después de 72 horas en jugo de kiwi, carne de res y carne pollo respectivamente; por lo que concluyeron que el fago STo2 podría ser un agente de Biocontrol prometedor en alimentos líquidos o sólidos contaminados con *Salmonella typhimurium*.

Kumar, Bhima, Kumar, & Ghosh (2020), también demostraron la reducción de poblaciones bacterias de *Salmonella* spp en piel de pollo y ensalada de zanahoria a través de los bacteriófagos líticos NINP13076 y NINP1162 quienes disminuyeron 1 log UFC/cm² luego de 4h y 6,7 a 5,4 log UFC/g luego de 3h la contaminación bacteriana en zanahoria y piel de pollo respectivamente.

Liu *et al.* (2020), aislaron un fago monovalente para controlar el crecimiento de *Salmonella enteritidis* en tufo y lechuga; el fago LSE7621 mostró una gran estabilidad a diferente pH y temperatura, reduciendo los recuentos bacterianos en 3,55 log₁₀ UFC/ml en el caso de la lechuga y una reducción más significativa para el tofu 3,83 ± 0,08 log₁₀ UFC/ml. Estas diferencias en el control del patógeno, fue atribuida por los investigadores a la composición fisicoquímica del alimento, además se ha determinado que el efecto lítico del fago se potencia cuando se aumenta su concentración en presencia de cantidades estables del patógeno, por otro lado los autores señalan que el uso de fagos monovalentes es más efectivo ya que su virulencia no suele reducirse como si ocurre con los polivalentes, así lo afirman (Ford *et al.*, 2014 ; Keen, 2014) quienes concluyeron que estos últimos suelen presentar una reducción de su efecto en cada hospedador.

Además Jonge, Nobrega, Brouns, & Dutilh (2019), afirman que gracias a que los fagos monovalentes solo afectan una cepa específica, se reduce el riesgo en el desarrollo de resistencias. Teniendo en cuenta todo lo anterior, el uso de fagos monovalentes como LSE7621 podría indicarse en una variedad de alimentos a diferentes temperaturas y pH, gracias a su gran estabilidad y efecto bactericida.

En otra investigación realizada por Huang *et al.* (2018), lograron demostrar una supresión prolongada de *Salmonella enteritidis* patógena, en diferentes alimentos listos para el consumo como leche, lechuga, salchicha mediante la aplicación del fago LPSE1; estableciéndolo como un agente de Biocontrol eficaz en diversas preparaciones de alimentos.

Woo Jun, Park, Wicklund, & Skurnik, (2018), aislaron y caracterizaron fagos para inhibir el crecimiento de *Yersinia enterocolitica* en carne de cerdo cruda, carne lista para el consumo y leche contaminada experimentalmente; donde los fagos Yen3-01 y fHe-Yen9-01 evitaron el crecimiento bacteriano y disminuyeron de 1 a 3 logaritmos con respecto a los recuentos iniciales; además los recuentos disminuyeron hasta llegar a niveles indetectables.

Debido a que los productos no solo pueden contaminarse con patógenos provenientes de materias primas utilizadas para su preparación o de humanos que fabrican o procesan el producto, Maura y Debarbieux (2011), realizaron un estudio donde contaminaron implementos de cocina, como tablas de cortar, cuchillos de madera /plástico, y manos artificiales; donde se obtuvo una inhibición de manera efectiva, con recuentos que disminuyeron en 1-2 logaritmos los niveles iniciales. Los investigadores decidieron volver a incluir a estos bacteriófagos para estudios posteriores debido a su buen desempeño en el control del patógeno.

Algo similar hicieron Zhou *et al.* (2019), cuando aislaron y caracterizaron el fago vB-LmoM-SH3-3 de amplio rango de hospedadores para *Listeria spp.*

siendo capaz de actuar sobre *Listeria monocytogenes* *L. innocua* y *L. welshimeri*. En este estudio se evaluó la eficacia del fago para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en salmón y jugo de naranja, donde fue capaz de reducir los recuentos en 4,54 log y 4,85 log, respectivamente luego de 72 horas, lo que demuestra su potente efecto bacteriostático.

Recientemente, Ishaq, Ebner, Syed, & Ubaid ur Rahman (2020) evaluaron el impacto del fago List-Shield (producto disponible comercialmente), en la reducción bacteriana de *Listeria monocytogenes* en superficies de carne de res refrigerada a $4 \pm 0,5$ ° C, donde se observó una reducción de 2,3 logaritmo de la población de *Listeria monocytogenes*, por otro lado los autores aseguran que no se presentaron alteraciones en cuanto a los parámetros de calidad en la carne.

En ese orden de ideas, es oportuno recordar que *Listeria monocytogenes*, puede sobrevivir y crecer en la superficie de la carne cruda a temperaturas de refrigeración, es decir, 4 ± 1 ° C (Lasagabas *et al.*, 2020), por lo que la aplicación de fagos como agentes de Biocontrol resulta conveniente para la garantía de la inocuidad alimentaria.

En cuanto a los biofilms, estos representan un problema difícil de erradicar en la industria alimentaria; debido a sus características de alta fijación y estabilidad, por lo que se han implementado numerosas estrategias físicas, químicas y biológicas como: ultrasonido, irradiación UV-C, plasma de oxígeno frío, extractos de plantas, recubrimientos bactericidas entre otros (Wang *et al.*, 2020). Sin embargo, estos han demostrado resultados limitados e insuficientes, es por ello que se ha aumentado el interés en el Biocontrol a través de fagos gracias a los excelentes resultados que se han obtenido con su aplicación; lo que sin lugar a dudas ha potenciado la búsqueda y estudio de nuevos fagos contra todas las bacterias patógenas.

Un ejemplo de ello son los estudios realizados recientemente por Wang *et al.* (2020), quienes evaluaron la capacidad del fago AZO145A para inactivar la formación de biopelículas de *Escherichia coli toxigénica Shiga (STEC) O145* formadas a las 24, 48 y 72 horas ; donde se obtuvieron una reducción 2,9, 1,9 y 1,9 log₁₀ UFC / cupón por fagos en las superficies de acero inoxidable, además también mostro una reducción de 3,1 en la carne de res contaminada por los biofilms presentes en los cupones de acero; lo que destaca al fago AZO145A como un gran inhibidor de biofilms y potente bactericida contra *STEC O145*.

Si bien es cierto que *STEC* es uno de los principales productores de biopelículas altamente resistente como así lo señalan (Ma *et al.*, 2019) y que el tiempo que tarda en transferirse el patógeno de la superficie al alimento es relativamente corto (10 segundos para el estudio anterior),el fago AZO145A pasaría a ser una alternativa muy viable y oportuna en la industria para la inhibición del patógeno tanto en forma de biofilms como plactónica.

Ali Gharieb, Saad, Mohamed, & Tartor (2020), también evaluaron y caracterizaron dos nuevos fagos líticos vB_SauM_ME18 y vB_SauM_ME126 con acción frente a biofilms de *Staphylococcus aureus* multidrogoresistente, quienes además inhibieron el crecimiento de *S. aureus* en leche UHT. La reducción de las biopelículas fue realmente significativa (P <0.05) después de 48 horas, así mismo el efecto bactericida en la leche fue satisfactorio, ambos fagos mostraron una reducción del 100% (MOI10) a una temperatura de 25°C. Dado que *S. aureus* es uno de los patógenos más implicados en la contaminación de leche, equipos de procesamiento y producción de mastitis subclínicas en vacas lecheras (Ruegg, 2017), es necesaria la implementación de una herramienta que logré abarcar todos los procesos en donde exista el riesgo de contaminación por el patógeno, lo que da cabida al uso de nuevos fagos que sean capaces de erradicar o inhibir la formación de biofilms, los cuales le confieren mayor resistencia a los antibióticos y materiales de

desinfección (Doulgeraki, Di Ciccio, Ianieri y Nychas, 2017 ; Vergara *et al.*, 2017), haciendo que estos sean ineficaces.

Anteriormente Yin *et al.* (2019), identificaron tres fagos eficaces para la inhibición de biofilms producidas por *Vibrio parahaemolyticus* (patógeno productor ETAs por consumo de mariscos principalmente). En esta investigación se demostró que los fagos lograron prevenir eficientemente la formación de biofilms, además pasadas las 48 horas del experimento, el recuento bacteriano logró disminuirse hasta niveles indetectables. Sin embargo, no se lograron los mismos resultados para el tratamiento de biopelículas formadas previamente, cabe recordar que estas una vez formadas son difíciles de erradicar y por ello estos fagos podrían ser ideales como método de prevención de biofilms de *V. parahaemolyticus* en diferentes procesos.

En efecto, los fagos sin lugar a duda representan un arma infalible en la lucha contra los biofilms , gracias a su capacidad de autoreplicación que favorece la entrada a la células que se encuentran protegidas por la biopelícula; por otro lado, en algunos fagos la presencia de sus enzimas hidrolíticas permite reducir las matrices extrapoliciméricas (Goodridge, Fong, Wang, & Delaquis, 2018). "*Las intervenciones que utilizan bacteriófagos se pueden realizar en diferentes puntos de la instalación de procesamiento de alimentos o en toda la cadena alimentaria para mejorar el proceso de control, así como para reducir los niveles de contaminación*"(Young Thung *et al.*, 2019, p.1).

3.2.2 Desinfectantes

La desinfección se ha usado como una de las principales prácticas de limpieza para controlar las infecciones (Yin *et al.*, 2019); sin embargo, el uso constante y desmedido de muchos desinfectantes químicos ha favorecido el desarrollo de resistencias bacterianas. Además, como se ha mencionado antes, varios investigadores han demostrado que los desinfectantes no son capaces de

inhibir completamente los patógenos, hecho que favorece la formación de biopelículas e incremento de infecciones (Charlebois, Jacques, Boulianne, & Archambault, 2017).

Así lo confirman Lasagabaster *et al.*, (2020), en su estudio, donde argumentan que la alta tolerancia a desinfectantes y la capacidad de formar biopelículas en superficies de contactos con alimentos de algunos patógenos como *Listeria monocytogenes*, favorece su permanencia en las instalaciones de procesamientos incluso por años y con ello el aumento de los casos de ETAs. Por otro lado, Spricigo, Bardina, Cortes, & Liagostera (2013), sostienen que muchos de los métodos usados en la desinfección alteran las características organolépticas de los alimentos; así mismo Pablos *et al.*, (2018), resaltan que es contraproducente utilizar desinfectantes en vegetales (recién obtenidos) porque pueden generarse sustancias nocivas y malos olores por la interacción de las sustancias orgánicas de los vegetales con los mismos.

Con base a todo lo dicho anteriormente, resulta razonable que se estén explorando otras alternativas que permitan controlar y reducir la propagación y/o presencia de estos patógenos en los diferentes procesos de producción de alimentos; donde vienen a posicionarse en escena los fagos, quienes han logrado frenar la diseminación de patógenos en los alimentos con mejores resultados frente a los desinfectantes de uso industrial; como se puede evidenciar en un estudio reciente llevado a cabo por Sevilla-Navarro, Catalá-Gregori, García, Cortés, & Marin (2020), quienes evaluaron el efecto de los fagos frente a *Salmonella infantis* y *Salmonella enteritidis* en superficies agrícolas durante una semana, obteniendo como resultado la reducción de 4,55 log₁₀ UFC/ml para *S. infantis* y 3,85 log₁₀ UFC/ml para *S. enteritidis*, después de aplicaciones consecutivas de fagos, además, se obtuvo la mayor erradicación del patógeno al quinto día. Este estudio fue realizado en las instalaciones de una granja, lo que pone en evidencia la acción de los bacteriófagos en condiciones reales, debido a que en la mayoría de los casos estas investigaciones se realizan *in vitro*. Los autores propusieron el uso de los

mismos como herramientas complementarias para la desinfección de instalaciones agrícolas quienes suelen ser un importante foco de contagio.

Se podría resumir que los productos a base de fagos representan una estrategia con mucho futuro para el mejoramiento de los procesos de desinfección tradicionales frente al control de patógenos.

3.2.3 Conservación

Los fagos prometen ser excelentes conservantes alimentarios gracias a la autoreplicación, una de sus grandes características; que les permite la reducción e inhibición oportuna de bacterias patógenas en los alimentos que son almacenados por diferentes periodos de tiempo y aún más en aquellos listos para el consumo que requieren una producción y manipulación más rigurosa, debido a que no pasaran por un proceso de higienización estricto sino que serán consumidos directamente.

Kim *et al.* (2020), plantea que no existen conservantes naturales eficientes que minimicen o detengan las alteraciones producidas por las bacterias, por lo que sugiere el uso de fagos que de acuerdo a su estudio logro demostrar que el fago VVP100 es un excelente conservante natural y de control en alimentos. También resalta el papel de LISTEX™ P100 (producto comercial a base de fagos), como conservante natural y de Biocontrol frente a *Listeria monocytogenes* en carnes, aves, pescados, mariscos y lácteos.

Zhou *et al.* (2019), en su estudio postulan el uso del fago SH3-3 como potente conservante natural para inhibir la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo y durante las diferentes etapas de producción de alimentos. Kazi y Annapure (2016), apoyan el uso de fagos en frutas y hortalizas frescas, para controlar eficazmente la contaminación bacteriana

debida a las limitaciones que presenta los conservantes químicos en estos alimentos.

Así mismo, Gouvêa, Mendonça, Lopez, & Batalha (2016), reconocieron el buen desempeño de un grupo de fagos en la conservación de alimentos refrigerados listos para el consumo, por reducir la presencia de *Salmonella typhimurium*, y surgieron tener en cuenta las concentraciones de fago, debido que a mayor concentración de fagos mayor capacidad de contagio. Así una vez más los bacteriófagos, desde el punto que quieran ser visto demuestran ser eficaces en la regulación de patógenos y conservación de alimentos, resaltando su origen natural y su capacidad para no alterar las características de los mismos.

3.2.4 Coctel de fagos

Los productos a base de cocteles de fagos mejoran las limitaciones que se presentan en el uso de algunos fagos con un rango de hospedador reducido, brindando mayor cobertura y eficacia en el control de patógenos. Por ello varios investigadores se han encargado de evaluar y demostrar los excelentes resultados que se obtienen con su aplicación y que al igual que usar fagos por separado son seguros y se pueden emplear en una variedad de procesos. Como ejemplo de ello se tiene lo siguiente:

Shebs-Maurine, Torres, Yeh-Parker, & de Mello (2020), determinaron la capacidad de un coctel de 7 bacteriófagos para disminuir las poblaciones de *Escherichia coli* O157: H7 en cortes de carne de res. Los resultados mostraron reducciones muy significativas pero específicamente 2 de los 7 fagos (MS1 026 y MS1 157) logran una lisis casi completa (99,9%). En cuanto a la temperatura el coctel no presento alteraciones, por lo que podría usarse en condiciones de frio y calor manteniendo resultados satisfactorios.

El-DougDoug *et al.* (2019), usaron un coctel de fagos para controlar el crecimiento de *Salmonella newport* en tomate cherry contaminado y almacenado por 3 días a 22°C cuyos resultados demostraron una reducción de 4,5 unidades logarítmicas en los tomates contaminados; lo que sugiere que los cocteles de fagos presentan una gran estabilidad y potencial para disminuir las poblaciones de *Salmonella newport* en alimentos listos para el consumo.

Clavijo *et al.* (2019), evaluaron la eficacia del coctel de fagos SalmoFREE® (mezcla de seis fagos) para el control de *Salmonella spp*, en una cría de pollos de engorde ubicada en una granja Colombiana, donde se obtuvo una reducción del 77,4 % de *Salmonella spp*, además en uno de los experimentos para el día 33 los recuentos fueron reducido al 0% pero debido a algunos inconvenientes técnicos no pudo garantizarse totalmente que se debería a la terapia con fagos. Así mismo, en el experimento se observó una estabilidad en el peso de los pollos tratados con fagos, por lo que se pudo concluir que la aplicación del coctel fue completamente segura en los pollos, ya que no logro evidenciarse mortalidad por su causa.

Este estudio amplía la visión del uso de cocteles de fagos para el control de infecciones por *Salmonella spp*, el cual que es considerado un patógeno principal en los productos avícolas con una gran importancia en las infecciones alimentarias asociadas al consumo de estos alimentos, por lo que resulta adecuada su aplicación en las primeras etapas de producción para evitar la entrada del mismo en la cadena alimentaria.

En un estudio más reciente desarrollado por Wójcik *et al.* (2020), donde se evaluó el desempeño de BAFASAL® (cuatro fagos) in vitro o in vivo frente al control de *Salmonella* en solución de electrolitos, pienso para pollos, ciego de pollos entre otros, se obtuvieron resultados donde la reducción de *Salmonella spp* fue 10 veces menor en todos los piensos tratados con el coctel de fago (presentación líquida, sólida y spray), frente al grupo de control, así mismo se obtuvo una eficacia igual en la solución de electrolitos contaminada experimentalmente, donde no se detectaron poblaciones bacterias luego de 6

horas de incubación. Por último en los ciegos de pollo (realizado in vivo) infectados con *Salmonella enteritidis* se obtuvo una reducción de más de 16 veces en comparación con el grupo que no recibió el tratamiento. Además, los pollos que recibieron el coctel mostraron mejores resultados en cuanto a las características de: peso corporal, ingesta media diaria de alimento y ganancia diaria promedio.

Todo lo expuesto anteriormente evidencia que el uso de cocteles de fagos es seguro para los animales; demostrando que el número y la variedad no representan un peligro para los mismos y que sin lugar a dudas son eficientes en la lucha contra las bacterias.

3.3 ASOCIACIÓN CON OTROS MATERIALES /MÉTODOS

Los fagos pueden utilizarse en unidad o en coctel como se ha detallado en párrafos anteriores, todo va a depender del objetivo que se quiere alcanzar. Si bien es cierto que algunas investigaciones han demostrado que los efectos se potencian cuando se realizan algunas sinergias entre fagos y materiales usados en desinfección, conservación, control entre otros; donde los fagos ya no actúan como protagonistas sino que pasan a ser complementarios, hecho que mejora aún más las expectativas y aceptación del personal encargado de los procesos de higienización y conservación porque no tendrían que abandonar sus métodos tradicionales sino que pasarían a mejorarlos con la implementación de fagos; ya que se debe reconocer que existen varios métodos de desinfección que son muy buenos y aún siguen vigentes.

Para ejemplificar estas sinergias se tienen los resultados de algunos ensayos como el de Komora *et al.* (2020), emplearon un sistema sinérgico que consistió en: presión hidrostática (HHP), Pediocina PA-1 y fago Listex™ P100 para eliminar a *Listeria monocytogenes* de la leche, esta combinación logró la mayor inactivación del patógeno desde el primer día hasta el final del experimento. Por otro lado, la combinación de sinergias es decir HHP y Pediocina PA-1, fueron eficaces durante el almacenamiento mientras que con el fago P100 y HHP lo

fueron al final del experimento. El efecto de cada elemento por separado no superó los resultados obtenidos por la sinergia. Los investigadores demostraron que este sistema podría ser una alternativa interesante como tratamiento no térmico para la eliminación de *L. monocytogenes*.

Alves *et al.* (2019), implementaron la incorporación del fago ϕ IBB-PF7A en películas a base de Alginato de Sodio reticuladas con Cloruro de Calcio para evitar la descomposición de carne de aves por *Pseudomonas fluorescens*, donde se apreció una reducción de 2 log de *P. fluorescens* en filete de pollo, gracias a la estabilidad que le brinda la placa al fago (incluidas condiciones de refrigeración), permitiéndole que las reducciones se prolongaran hasta 5 días. Esta sinergia representa un método ideal para evitar el deterioro de los alimentos gracias al sistema de administración y preservación proporcionada por la película y el efecto antimicrobiano del fago, lo que protege y mejora la vida útil de los productos.

Anteriormente, Gouvêa *et al.* (2016), realizaron un estudio similar utilizando en este caso almohadillas absorbentes como matriz, donde emplearon una mezcla de fagos contra *Salmonella typhimurium* en carne, mostrando reducciones de hasta 4,36 logaritmos durante 48 horas con una liberación constante y gradual del fago. La incorporación de almohadillas absorbentes con fagos permite conservar mejor las características del alimento; por una parte las almohadillas controlan y retienen los líquidos liberados por las carnes empacadas en bandejas, lo que mejora su presentación y por otro lado los fagos se encargan de controlar la población bacteriana.

En definitiva los fagos resultan muy prometedores y versátiles en cuanto a su uso y adaptación lo que permite extenderse su uso a otros dominios como plantas, humanos y animales, así lo asegura Ramírez, Neuman, & Ramírez (2020), que proponen el uso de coctel fagos para controlar la enfermedad de Moko (*Ralstonia solanacearum*) del banano ; quienes en su estudio

encontraron que 2 de los 8 fagos aplicados fueron capaces de inhibir la bacteria por debajo del nivel de detección en 24 horas.

4. CONCLUSIÓN

Frente a los resultados reportados por los investigadores y a todo lo expuesto anteriormente, se puede deducir que los bacteriófagos tienen la capacidad de controlar todas las variables implicadas en la infección o contaminación bacteriana, en cada una de las etapas de producción del alimento; garantizando la inocuidad en cada paso.

Por otro lado, los fagos constituyen la última pieza que faltaban en el rompecabezas, por abordar todas las dificultades y cumplir con las exigencias de consumidores y productores pues se destacan por ser naturales, seguros, diversos (en cuanto a usos/ aplicaciones y tipos), económicos y como si fuera poco no reaccionan con la naturaleza del alimento, es decir, no se mezcla con el producto ni generan residuos, lo que mantiene intacta las propiedades organolépticas y nutritivas del alimento.

Podría pensarse entonces que a futuro los bacteriófagos se conviertan en la piedra angular de la industria alimentaria; desplazando a los métodos tradicionales, gracias a todas las ventajas que presenta frente a los mismos.

Por último, es importante que antes de usar un fago, este haya sido purificado y caracterizado correctamente para evitar el uso de fagos lisogénicos; así mismo, deben evaluarse bajo todas las condiciones para garantizar que sea efectiva su acción en el alimento.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedon, S. T., García, P., Mullany, P., & Aminov, R. (2017). Editorial: Phage Therapy: Past, Present and Future. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 981. Recuperado de: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00981>
- Alegre Vilas, I., Abadias Seró, M., Colás Medà, P., Collazo Cordero, C., & Viñas Almenar, I. (2020). Bioconservación frente a patógenos de transmisión alimentaria en frutas y hortalizas mínimamente procesadas. *Arbor*, 196(795), 543. Recuperado de: <https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1007>
- Ali Gharieb, R. M., Saad, M. F., Mohamed, A. S., & Tartor, Y. H. (2020). Characterization of two novel lytic bacteriophages for reducing biofilms of zoonotic multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and controlling their growth in milk. *LWT*, 124, 109145. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109145>
- Alves, D., Marques, A., Milho, C., Costa, M. J., Pastrana, L. M., Cerqueira, M. A., & Sillankorva, S. M. (2019). Bacteriophage ϕ IBB-PF7A loaded on sodium alginate-based films to prevent microbial meat spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 291, 121–127. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.026>
- Charlebois, A., Jacques, M., Boulianne, M., & Archambault, M. (2016). Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in the food industry. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.009>
- Charlebois, A., Jacques, M., Boulianne, M., & Archambault, M. (2017). Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in the food industry. *Food Microbiology*, 62, 32–38. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.009>
- Chylkova, T., Cadena, M., Ferreira, A., & Pitesky, M. (2017). Susceptibility of salmonella biofilm and planktonic bacteria to common disinfectant agents used in poultry processing. *Journal of Food Protection*, 80(7), 1072–1079. Recuperado de: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-393>
- Clavijo, V., Baquero, D., Hernandez, S., Farfan, J. C., Arias, J., Arévalo, A., ... Vives-Flores, M. (2019). Phage cocktail SalmoFREE® reduces Salmonella on a commercial broiler farm. *Poultry Science*, 98(10), 5054–5063. Recuperado de: <https://doi.org/10.3382/ps/pez251>
- De Jonge, P. A., Nobrega, F. L., Brouns, S. J. J., & Dutilh, B. E. (2019, January 1). Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range.

Trends in Microbiology, Vol. 27, pp. 51–63. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.006>

El-DougDoug, N. K., Cucic, S., Abdelhamid, A. G., Brovko, L., Kropinski, A. M., Griffiths, M. W., & Anany, H. (2019). Control of Salmonella Newport on cherry tomato using a cocktail of lytic bacteriophages. *International Journal of Food Microbiology*, 293, 60–71. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.003>

Fernández, L. Rodríguez, A. y Gutiérrez, D. (2020). *Los bacteriófagos: los virus que combaten infecciones*. Recuperado de: <https://ezproxyucor.unicordoba.edu.co:2422/es/ereader/unicordoba/133061?page=7>

Fernández, D. G., Llamas, L. F., González, A. R., & Suárez, P. G. (2020). *BACTERIÓFAGOS Y ENDOLISINAS ENDOLYSINS IN THE FOOD*. 196. Recuperado de : <http://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/view/2358/3472>

Gong, C., & Jiang, X. (2017). Application of bacteriophages to reduce Salmonella attachment and biofilms on hard surfaces. *Poultry Science*, 96(6), 1838–1848. Recuperado de: <https://doi.org/10.3382/ps/pew463>

Goodridge, L., Fong, K., Wang, S., & Delaquis, P. (2018). *Bacteriophage-based weapons for the war against foodborne pathogens*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.03.017>

Gouvêa, D. M., Mendonça, R. C. S., Lopez, M. E. S., & Batalha, L. S. (2016). Absorbent food pads containing bacteriophages for potential antimicrobial use in refrigerated food products. *LWT - Food Science and Technology*, 67, 159–166. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.043>

Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Fernández, L., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2017). Applicability of commercial phage-based products against *Listeria monocytogenes* for improvement of food safety in Spanish dry-cured ham and food contact surfaces. *Food Control*, 73, 1474–1482. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.007>

Gutiérrez Fernández, D., Fernández Llamas, L., Rodríguez González, A., & García Suárez, P. (2020). Bacteriófagos y endolisinas en la industria alimentaria. *Arbor*, 196(795), 544. Recuperado de: <https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1008>

Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., ... Balcão, V. M. (2018, July 1). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*, Vol. 212–213, pp. 38–58. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007>

- Hernández-santiago, R., Jiménez-salas, Z., & Pla-soler, R. (2004). *Aplicación de bacteriófagos en alimentos*. 1(12). Recuperado de: <http://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/295/276>
- Huang, C., Shi, J., Ma, W., Li, Z., Wang, J., Li, J., & Wang, X. (2018). Isolation, characterization, and application of a novel specific Salmonella bacteriophage in different food matrices. *Food Research International*, 111, 631–641. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.071>
- Ishaq, A., Ebner, P. D., Syed, Q. A., & Ubaid ur Rahman, H. (2020). Employing list-shield bacteriophage as a bio-control intervention for *Listeria monocytogenes* from raw beef surface and maintain meat quality during refrigeration storage. *LWT*, 132, 109784. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109784>
- Jorquera, D., Galarce, N., & Borie, C. (2015a). El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: Bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. *Revista Chilena de Infectología*, 32(6), 678–688. Recuperado de: <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000700010>
- Jorquera, D., Galarce, N., & Borie, C. (2015b). El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: Bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. *Revista Chilena de Infectología*, 32(6), 678–688. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000700010>
- Kim, H., Kim, Y.-T., Kim, H. B., Choi, S. H., & Lee, J.-H. (2020). Characterization of bacteriophage VVP001 and its application for the inhibition of *Vibrio vulnificus* causing seafood-borne diseases. *Food Microbiology*, 103630. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103630>
- Komora, N., Maciel, C., Pinto, C. A., Ferreira, V., Brandão, T. R. S., Saraiva, J. M. A., ... Teixeira, P. (2020). Non-thermal approach to *Listeria monocytogenes* inactivation in milk: The combined effect of high pressure, pediocin PA-1 and bacteriophage P100. *Food Microbiology*, 86, 103315. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103315>
- Kumar, R. N., Bhima, B., Kumar, P. U., & Ghosh, S. (2020). Bio-control of *Salmonella* spp. in carrot salad and raw chicken skin using lytic bacteriophages. *LWT*, 122, 109039. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109039>
- Lasagabaster, A., Jiménez, E., Lehnerr, T., Miranda-Cadena, K., & Lehnerr, H. (2020). Bacteriophage Biocontrol to fight *Listeria* outbreaks in seafood. *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111682. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111682>
- Liu, A., Liu, Y., Peng, L., Cai, X., Shen, L., Duan, M., ... Li, C. (2020). Characterization of the narrow-spectrum bacteriophage LSE7621 towards

- Salmonella Enteritidis and its Biocontrol potential on lettuce and tofu. *LWT*, *118*, 108791. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108791>
- Liu, A., Wang, Y., Cai, X., Jiang, S., Cai, X., Shen, L., ... Wang, X. (2019). *Characterization of endolysins from bacteriophage LPST10 and evaluation of their potential for controlling Salmonella Typhimurium on lettuce*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108372>
- Ma, Z., Bumunang, E. W., Stanford, K., Bie, X., Niu, Y. D., & McAllister, T. A. (2019). Biofilm formation by shiga toxin-producing escherichia coli on stainless steel coupons as affected by temperature and incubation time. *Microorganisms*, *7*(4). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7040095>
- Moye, Z. D., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2018a). Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*, *10*(4), 1–22. Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/v10040205>
- Moye, Z. D., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2018b, April 19). Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*, Vol. 10. <https://doi.org/10.3390/v10040205>
- OMS. (2015). Recuperado de: https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodbornediseases/amro_es.pdf?ua=1
- OMS. (2020). Inocuidad de los alimentos. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Pablos, C., Romero, A., de Diego, A., Vargas, C., Bascón, I., Pérez-Rodríguez, F., & Marugán, J. (2018). Novel antimicrobial agents as alternative to chlorine with potential applications in the fruit and vegetable processing industry. *International Journal of Food Microbiology*, *285*, 92–97. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.029>
- Ramírez, M. (2005). Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca de Soto. Recuperado de: <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/236/Actividad%20inhibitoria%20de%20cepas%20de%20bacterias.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ramírez, M., Neuman, B. W., & Ramírez, C. A. (2020). Bacteriophages as promising agents for the biological control of Moko disease (*Ralstonia solanacearum*) of banana. *Biological Control*, *149*, 104238. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.Biocontrol.2020.104238>
- Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and

prevention. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10381–10397. Recuperado de: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>

Sevilla-Navarro, S., Catalá-Gregori, P., García, C., Cortés, V., & Marin, C. (2020). Salmonella Infantis and Salmonella Enteritidis specific bacteriophages isolated from poultry faeces as a complementary tool for cleaning and disinfection against Salmonella. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 68, 101405. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101405>

Shahin, K., Bouzari, M., Wang, R., & Yazdi, M. (2019). *Prevalence and molecular characterization of multidrug-resistant Shigella species of food origins and their inactivation by specific lytic bacteriophages*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108252>

Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2017, January 1). Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiologica*, Vol. 62, pp. 17–55. Recuperado de: <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0471-x>

Shebs-Maurine, E. L., Torres, E. S., Yeh-Parker, Y., & de Mello, A. S. (2020). Application of MS bacteriophages on contaminated trimmings reduces Escherichia coli O157 and non-O157 in ground beef. *Meat Science*, 170. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108243>

Wang, C., Hang, H., Zhou, S., Niu, Y. D., Du, H., Stanford, K., & McAllister, T. A. (2020). Bacteriophage Biocontrol of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) O145 biofilms on stainless steel reduces the contamination of beef. *Food Microbiology*, 92, 103572. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103572>

Wernicki, A., Nowaczek, A., & Urban-Chmiel, R. (2017). Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. *Virology Journal*, 14(1). Recuperado de: <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0849-7>

Wójcik, E. A., Stanczyk, M., Wojtasik, A., Kowalska, J. D., Nowakowska, M., Lukasiak, M., ... Dastych, J. (2020). Comprehensive evaluation of the safety and efficacy of BAFASAL® bacteriophage preparation for the reduction of salmonella in the food chain. *Viruses*, 12(7). Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/v12070742>

Woo Jun, J., Park, C., Wicklund, A., & Skurnik, M. (2018). *Bacteriophages reduce Yersinia enterocolitica contamination of food and kitchenware*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.007>

Yin, Y., Ni, P., Liu, D., Yang, S., Almeida, A., Guo, Q., ... Wang, D. (2019). Bacteriophage potential against Vibrio parahaemolyticus biofilms. *Food Control*, 98, 156–163. Recuperado de:

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.034>

Young Thung, T., Lee, E., Ainy Mahyudin, N., Anuradha, K., Mazlan, N., Hao Kuan, C., ... Radu, S. (2019). *Evaluation of a lytic bacteriophage for bio-control of Salmonella Typhimurium in different food matrices*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.033>

Zhou, C., Zhu, M., Wang, Y., Yang, Z., Ye, M., Wu, L., ... Zhang, H. (2019). *Broad host range phage vB-LmoM-SH3-3 reduces the risk of Listeria contamination in two types of ready-to-eat food*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106830>