



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

## Grao en Bioloxía

### Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Revisión bibliográfica: Aplicaciones de los bacteriófagos como agentes antibacterianos en la industria agroalimentaria.**

**Revisión bibliográfica: Aplicacións dos bacteriófagos como axentes antibacterianos na industria agroalimentaria.**

**Literature review: Applications of bacteriophages as antibacterial agents in the food industry.**

**Alba Rodríguez Lamas**

**Curso: 2022 - 2023. Convocatoria: Xuño.**

*Director(es) Académico: José Pablo Fidalgo Paredes*

## ÍNDICE

### RESUMEN/RESUMO/SUMMARY Y PALABRAS CLAVE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. MATERIAL Y MÉTODOS. ....	3
4. BACTERIÓFAGOS.....	3
4.1 ¿Qué son los bacteriófagos? .....	3
4.2 Características y taxonomía.....	4
4.3 Ciclo de vida.....	4
4.4 Endolisinas de bacteriófagos. ....	5
5. APLICACIÓN DE LOS BACTERIÓFAGOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. ....	6
5.1 Control precosecha/sacrificio. ....	7
5.2 Desinfección de las superficies de procesamiento.....	8
5.3 Control postcosecha.....	10
5.4 Bioconservantes.....	11
6. PREPARADOS COMERCIALES DE BACTERIÓFAGOS. ....	12
6.1 Estudios sobre la aplicación de preparados comerciales de bacteriófagos. ....	13
7. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS BACTERIÓFAGOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. ....	14
8. FACTORES QUE AFECTAN A LA EFICACIA DE LOS BACTERIÓFAGOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.....	16
9. CONCLUSIÓN.....	18
10. BIBLIOGRAFÍA.....	19

## **RESUMEN**

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) implican una elevada morbilidad y mortalidad; según indica la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2010 se registraron 600 millones de casos. Los métodos químicos y físicos para conseguir alimentos más seguros provocan una pérdida de la calidad y cualidades de estos. Asimismo, la resistencia a los antibióticos sigue aumentando por su uso excesivo, por lo que se necesitan nuevas opciones.

En esta revisión bibliográfica, se estudia el uso de los bacteriófagos como alternativa en la industria alimentaria para lograr la inocuidad de los alimentos debido a la gran especificidad que presentan para eliminar únicamente los microorganismos patógenos.

**PALABRAS CLAVE:** bacteriófago, antibacterianos, endolisinas, biocontrol, industria alimentaria.

## **RESUMO**

As enfermidades de transmisión alimentaria (ETA) implican unha elevada morbilidade e mortalidade; segundo a Organización Mundial da Saúde (OMS), no ano 2010 rexistráronse 600 millóns de casos. Os métodos químicos e físicos para conseguir alimentos máis seguros provocan unha perda de calidade e cualidades destes. Así mesmo, a resistencia aos antibióticos segue aumentando polo seu uso excesivo, polo que son necesarias novas opcións.

Nesta revisión bibliográfica, estúdase o uso dos bacteriófagos como alternativa na industria alimentaria para lograr a inocuidade dos alimentos debido a gran especificidade que presentan para eliminar só microorganismos patóxenos.

**PALABRAS CLAVE:** Bacteriófago, antibacteriano, endolisinas, biocontrol, industria alimentaria.

## **SUMMARY**

Foodborne diseases (ETA) involve high morbidity and mortality, according to the World Health Organization (WHO), in 2010 there were 600 million cases. The chemical and physical methods to get safer food cause a loss of quality and qualities of these. Likewise, resistance to antibiotics continues to increase due to their excessive use, so new options are needed.

In this bibliographical review, the use of bacteriophages is studied as an alternative in the food industry to achieve food safety due to the great specificity that they present to eliminate only pathogenic microorganisms.

**KEY WORDS:** bacteriophage, antibacterials, endolysins, biocontrol, food industry.

## 1. INTRODUCCIÓN.

Un gran reto al que se enfrenta la población mundial es reducir el aumento de las enfermedades transmitidas por alimentos, ETA, definidas por Ge et al. (2022) como las enfermedades provocadas por el consumo de alimentos contaminados por microorganismos patógenos, toxinas y sustancias químicas. Esto se logrará a través de la inocuidad de los alimentos, que Jorquera et al. (2015) define como la seguridad de que los alimentos no representan un riesgo para el consumidor.

Las ETA son un problema reiterado en países en vías de desarrollo que debe ser considerado desde un carácter social, económico, cultural y político, esto se debe a que afecta de forma negativa en el desarrollo socioeconómico y en la salud de la población de estos países. El estado de salud de las personas depende en gran medida de la calidad que presentan los alimentos, la cual depende de la higiene y calidad sanitaria a lo largo de la cadena alimentaria, desde el campo hasta el consumidor. El resultado de los productos mal procesados o preparados supone una elevada incidencia de infecciones (Kopper et al., 2009). Además, la intensificación e industrialización de la agricultura y ganadería para satisfacer la demanda mundial de los alimentos plantean a la vez oportunidades y dificultades para la inocuidad de los alimentos, derivados de su distribución internacional (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2020)

Como informa la Organización Mundial de la Salud (OMS) la inocuidad de los alimentos, la nutrición y la seguridad alimentaria están estrechamente vinculadas. Los alimentos poco saludables causan enfermedades y desnutrición. Del mismo modo, cada año se producen pérdidas económicas provocadas por las ETA por valor de casi 100 mil millones de euros. En la Conferencia Internacional sobre la Inocuidad Alimentaria celebrada en el año 2019 (OMS, 2019), se reafirmó la importancia de lograr la inocuidad de los alimentos para cumplir los Objetivos de Desarrollo Sostenible, que requiere que los gobiernos hagan de la inocuidad de los alimentos una prioridad de salud pública.

Según la OMS, (2015) las ETA son responsables de una gran morbilidad y mortalidad; en 2010 se registraron 600 millones de casos y 420 mil muertes, siendo las principales causas los agentes infecciosos *Campylobacter* spp, norovirus y *Salmonella* sp. Otras ETA frecuentes son las causadas por *Listeria*

*monocytogenes*, *Shigella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7. Aun así, hay 250 agentes causantes de ETA que pueden ser biológicos, químicos o físicos (Jorquera et al., 2015).

En un estudio realizado en países centroamericanos, la falta de inocuidad de los alimentos supone un problema que se ve reflejado en distintos tipos de enfermedades, provocadas por microorganismos que comprenden coliformes fecales *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes* (Kopper et al., 2009).

El Centro Europeo para la Prevención y Control de las Enfermedades (ECDC) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) realizaron un informe en 2021 sobre las zoonosis, enfermedades infecciosas que se transmiten entre animales y humanos, más frecuentes en humanos que son la campilobacteriosis y salmonelosis con aproximadamente 130 mil casos y 60 mil respectivamente. La detección de los microorganismos infecciosos en animales productores de alimentos permite reducir las enfermedades en humanos (European Food Safety Authority [EFSA] & European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC], 2022).

Se han utilizado diferentes tratamientos con el fin de aumentar la seguridad de los alimentos, aunque muchos tienen como problema asociado que disminuyen la calidad y cualidades de los alimentos. Los tratamientos térmicos modifican las propiedades organolépticas (Kazi & Annapure, 2016), los conservantes químicos, afectan a la salud humana, y los desinfectantes químicos que se utilizan para frutas y verduras, dañan los equipos de procesamiento (Moye et al., 2018). Una desventaja que presentan estos procedimientos es que eliminan tanto las bacterias patógenas como las beneficiosas.

Otra forma de disminuir las enfermedades transmitidas por alimentos es el uso de antibióticos, pero su utilización inadecuada puede conducir a un incremento de las bacterias resistentes a ellos (Gutiérrez Fernández et al., 2020). La resistencia a los antibióticos en *Campylobacter* y *Salmonella* es alta, según un informe de ECDC y EFSA en 2019/2020 (EFSA y ECDC, 2022). Por lo tanto, es

necesario encontrar alternativas a los antibióticos para luchar contra las bacterias patógenas (Gutiérrez Fernández et al., 2020).

Entre los métodos más recientes se ha propuesto conseguir la inocuidad de los alimentos con el uso de bacteriófagos, que por su alta especificidad se convierten en una gran herramienta para eliminar las bacterias no deseadas durante la producción de los alimentos, y además no perturban la flora microbiana natural (Hagens y Loessner, 2007).

## **2. OBJETIVOS.**

El objetivo de este trabajo es elaborar una revisión bibliográfica sobre el empleo de bacteriófagos en la industria alimentaria, centrándose fundamentalmente en sus aplicaciones y en las ventajas y desventajas que presenta su uso.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS.**

La búsqueda de los artículos utilizados en esta revisión bibliográfica se realizó en diferentes bases de datos, entre las que destacan PubMed, Google Scholar y Web of Science, mediante la introducción de términos como “bacteriophages in the food industry” y “applications of bacteriophages in the food industry” para encontrar la información más general. Después, se efectuó una búsqueda más refinada sobre las características de los bacteriófagos, sus aplicaciones, ventajas y desventajas y los factores que le afectan. También se revisaron los artículos que aparecen como similares al realizar la búsqueda en las distintas bases de datos.

Asimismo, se consultaron páginas web como la de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Centro Europeo para la Prevención y Control de las Enfermedades (ECDC) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

## **4. BACTERIÓFAGOS.**

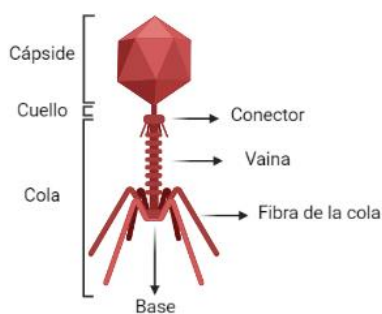
### **4.1 ¿Qué son los bacteriófagos?**

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus que infectan específicamente bacterias (Ge et al., 2022; Wang & Zhao, 2022). Fueron descubiertos por Ernest Hanbury Hankin al detectar actividad antibacteriana pero no pudo identificarlos y más tarde, Fleix d'Herelle los acuñó con el nombre de

bacteriófagos (Sharma et al., 2017). Los fagos se encuentran dispersos por todos los ambientes, abarcando también los alimentos, donde regulan las poblaciones bacterianas (Gutiérrez Fernández et al., 2020), pero no suponen un problema para los humanos, animales y plantas (Sillankorva et al., 2012). Por tanto, son las especies más numerosas de la Tierra (Garvey, 2022).

#### 4.2 Características y taxonomía.

Los bacteriófagos se caracterizan por medir entre 20 y 200 nm (Kazi & Annapure, 2016). Los fagos se pueden clasificar según el tipo de ácido nucleico, en fagos de tipo I (virus de ADN bicatenario), tipo II (virus de ADN monocatenario), tipo III (virus de ARN bicatenario) y de tipo IV (virus de ARN monocatenario) (Wang & Zhao, 2022). Asimismo, según su estructura, se pueden catalogar en fagos caudales, poliédricos, filamentosos y pleomórficos (Kazi & Annapure, 2016).



**Fig. 1:** Estructura bacteriófago.  
Fuente: elaboración propia.

Existen una gran variedad de fagos, los cuales se agrupan en trece familias; la mayoría pertenece al orden Caudovirales que se caracteriza por poseer la cola unida por un conector a la cápside de tipo icosaédrica que protege una molécula de ADN bicatenario (Gutiérrez Fernández et al., 2020; Jamal et al., 2019). Dentro de dicha orden se diferencian tres familias según la estructura

de su cola: *Myoviridae* (cola retráctil), *Siphoviridae* (cola larga no retráctil) y *Podoviridae* (cola corta) (Fig.1) (Wang & Zhao, 2022; Gutiérrez Fernández et al., 2020).

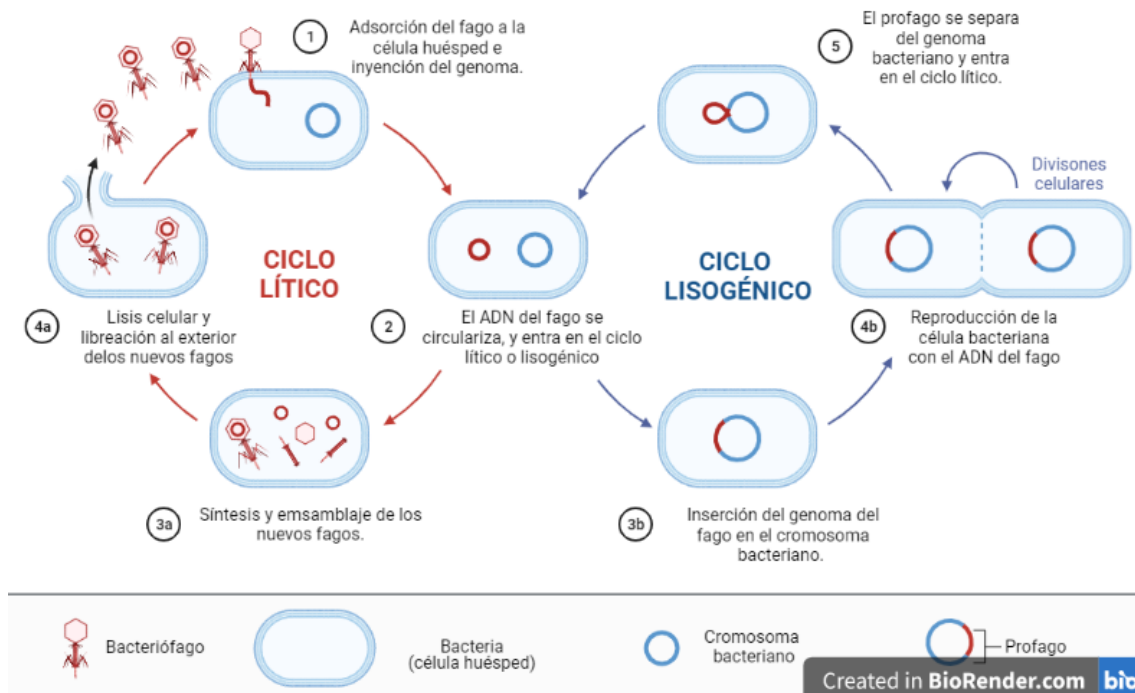
#### 4.3 Ciclo de vida.

Según su ciclo replicativo se pueden clasificar en dos tipos de fagos: fagos líticos y fagos lisogénicos (Ge et al., 2022). El ciclo se inicia por la adsorción e invasión del fago a la bacteria huésped a través de receptores específicos en la superficie de esta, como los lipopolisacáridos, ácidos teicoicos y proteínas, los cual les confieren la gran especificad nombrada anteriormente (Wang & Zhao, 2022; Sharma et al., 2017). Después se inyecta el material genético en la bacteria huésped y se circulariza (Jorquera et al., 2015). Luego, en el ciclo lítico los fagos se multiplican en el interior bacteriano gracias a la maquinaria molecular de esta,



para posteriormente lisarla y ser liberados al exterior (Gutiérrez Fernández et al., 2020; Doss et al., 2017). Estos nuevos fagos infectarán otras células produciendo su lisis, la duración de este ciclo es de una a dos horas (Fig. 2A) (Kazi & Annapure, 2016).

En el ciclo lisogénico, el genoma del fago, denominado profago, se integra en el cromosoma bacteriano (Garvey, 2022) y se replican de forma conjunta, permaneciendo latente o entrando en un ciclo lítico (Fig. 2B) (Jorquera et al., 2015).



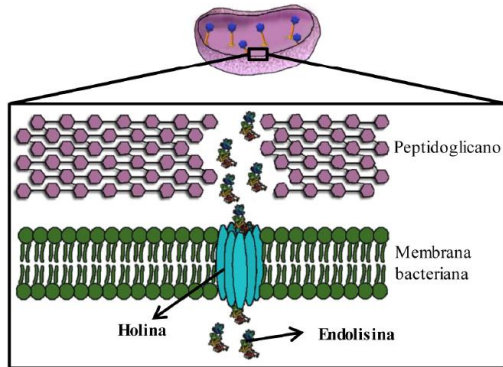
**Fig. 2:** Representación del ciclo lítico (parte A) y del ciclo lisogénico (parte B). Fuente: elaboración propia.

Los fagos líticos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento y la propagación de los microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos (Ge et al., 2022) y son una alternativa segura para aumentar la seguridad alimentaria y la inocuidad de los alimentos (Sillankorva et al., 2012). La aplicación de los fagos puede superar algunas de las limitaciones que reducen la eficacia de los métodos tradicionales como productos químicos o irradiaciones (Hudson et al., 2005)

#### 4.4 Endolisinas de bacteriófagos.

Las endolisinas, también conocidas como lisinas o lisoenzimas de fago o enzimas mureolíticas, son hidrolasas de peptidoglicano codificadas por

bacteriófagos que degradan el peptidoglicano de la bacteria huésped al final del ciclo lítico (Schmelcher et al., 2012; Gerstmans et al., 2018; Loessner, 2005). Las funciones de las endolisinas son reconocer el sustrato y la hidrólisis enzimática (Loessner, 2005).



Las holinas se insertan en las membranas formando poros para facilitar el paso de las endolisinas. (Schmelcher et al., 2012). Las lisinas degradan los enlaces de peptidoglicano de la pared celular y se liberan los nuevos bacteriófagos (Schmelcher & Loessner, 2016) (Fig.3).

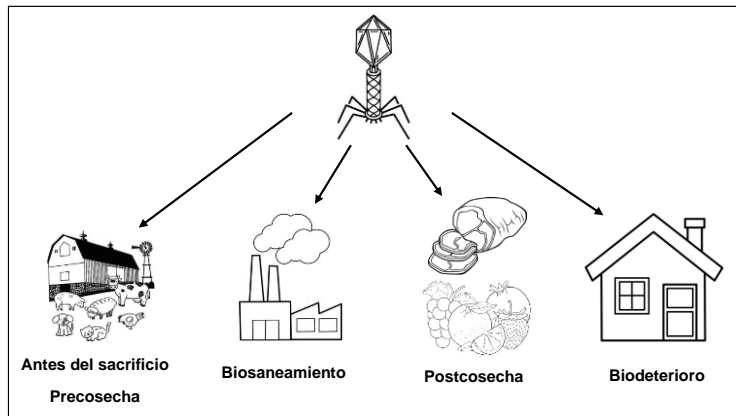
**Fig. 3:** Lisis de una bacteria Grampositiva por el sistema lisina/holina.  
Fuente: (Gutiérrez Fernández et al., 2020)

La estructura de las endolisinas depende del tipo de bacteria que infecta el fago; las bacterias huésped Gram negativas, estas son endolisinas globulares con un único dominio enzimáticamente activo que lisa el peptidoglicano, y para Gram positivas endolisinas modulares, con dominios enzimáticos activos y de unión a la pared celular (Gerstmans et al., 2018; Schmelcher & Loessner, 2016).

La ventaja de las lisinas de fago frente a otros métodos tradicionales, como es el uso de antibióticos, es una gran especificidad por ciertos tipos de peptidoglicano, lo que ayuda a evitar el desenvolvimiento de cepas resistentes (Schmelcher et al., 2012). Generalmente se usan en bacterias Gram positivas (Loessner, 2005), donde al carecer de membrana externa se pueden aplicar también de forma externa (Schmelcher & Loessner, 2016).

## **5. APLICACIÓN DE LOS BACTERIÓFAGOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.**

Existen dos puntos principales de contaminación en la producción de la cadena alimentaria: los alimentos, que pueden contener bacterias patógenas para los seres humanos, y los manipuladores de alimentos que pueden contaminar los alimentos durante su proceso de producción (Maura & Debarbieux, 2011).



**Fig. 4:** Aplicaciones de los bacteriófagos en la industria alimentaria. Fuente: Elaboración propia.

Debido a esto, los bacteriófagos se pueden aplicar como agentes de biocontrol antes y después de la cosecha, en el procesamiento de los alimentos y en las superficies de la industria (Greer, 2005; Bhardwaj et al., 2015) (Fig. 4).

### 5.1 Control precosecha/sacrificio.

La aplicación de los bacteriófagos en el período previo al sacrificio se realiza debido a que los animales actúan como reservorio de infecciones zoonóticas y al entrar en la cadena alimentaria causan enfermedades y muertes, ya que las condiciones de confinamiento en las que se encuentran los animales de las granjas son propicias para un incremento de enfermedades infecciosas (Endersen & Coffey, 2020). De manera similar, el sacrificio de los animales permite que ciertas bacterias contaminen las carnes crudas, e incrementan las posibilidades de contraer infecciones (Kuek et al., 2022). En esta etapa, los fagos se administran por vía oral, en el agua de los animales o en su alimento (Sillankorva et al., 2012). El uso de los fagos en la precosecha consiste en esparcirlos sobre el cultivo o añadirlos en el agua de riego de los cultivos (Vikram et al., 2022).

La campilobacteriosis humana es una enteritis bacteriana causada principalmente por *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni*, que habitan en los intestinos de muchas aves (Carvalho et al., 2010). Loc Carrillo et al. (2005) y Carvalho et al. (2010) realizaron estudios similares, los primeros utilizaron los fagos CP8 y CP34 y los segundos un cóctel de tres fagos: phiCcolBB35, phiCcolBB37, phiCcolBB12 que se administraron por vía oral en diferentes concentraciones a pollos de engorde. En el primer estudio el resultado obtenido fue una disminución entre 0,5 y 5 log(UFC/g) con respecto al control sin tratar y en el segundo una reducción de 2 log(UFC/g). Estos cambios en la reducción se

atribuyeron a la combinación fago-*Campylobacter*, la concentración de fago utilizada y el periodo transcurrido después de la administración.

Bhardwaj et al. (2015), en una revisión sobre los bacteriófagos como agentes de biocontrol, recogen un estudio donde se aisló el bacteriófago, CEV1, de ovejas que eran resistentes a la colonización de *Escherichia coli* O157:H7 y se usó para reducir esta misma infección en ovejas. Luego para comparar el efecto de un solo fago con respecto a un cóctel de fagos, el fago CEV1 se combina con el fago CEV2 con alta especificidad para *E. coli* O157:H7. Se observó que la combinación de ambos fagos reduce en 3 unidades logarítmicas la infección con respecto al control. Por tanto, los autores concluyen que el cóctel de fagos es más eficaz que un fago individualmente.

En una revisión sobre el uso de los bacteriófagos en la industria agroalimentaria de Kuek, Mclean y Palombo (2022) recogen un estudio donde un cóctel de tres fagos previamente aislados de huertos de manzanos, fue capaz de reducir en un 99% la población bacteriana *in vitro*. En esta misma revisión reúnen otra investigación de la marchitez bacteriana en tomates causada por *Ralstonia solanacearum* y encontraron que durante el experimento no apareció cuando las plantas de tomate fueron tratadas con el fago específico de *R. solanacearum* (RSL1), pero sí después de 18 días en el grupo control tras la infección.

## **5.2 Desinfección de las superficies de procesamiento.**

Los bacteriófagos se utilizan en la industria alimentaria como desinfectantes de las superficies de procesamiento, para así mejorar la seguridad de los alimentos, esto se denomina “biosaneamiento por fagos”, así se evita que los alimentos entren en contacto directo con bacterias patógenas que se encuentran en las superficies (Bhardwaj et al., 2015), lo cual puede prevenir infecciones bacterianas (Sulakvelidze, 2013). La eliminación de las biopelículas, matriz que rodea las células bacterianas, es el paso definitivo para lograr la máxima desinfección en la industria alimentaria. Las biopelículas suponen una amenaza para la salud pública, y con la aplicación de los bacteriófagos y endolisinas se eliminan las bacterias patógenas mediante la hidrólisis de la pared celular que provoca la lisis por un desequilibrio osmótico (Harada et al., 2018).

En la revisión de Gutiérrez et al. (2016) muestran la capacidad de tres fagos (LiMN4L, LiMN4p y LiMN17), de forma individual y en cóctel, que infectan a *Listeria monocytogenes* frente a biopelículas formadas en superficies de acero inoxidable, anteriormente recubierto con caldo de pescado para simular el ambiente de una industria alimentaria. Aplicados de forma individual, los fagos redujeron la población de células patógenas en 3 unidades logarítmicas, mientras que el cóctel de fagos lo redujo a niveles indetectables. Por tanto, el cóctel de fagos es más efectivo que los fagos individualmente.

Sadekuzzaman et al. (2017) realizaron un estudio para comprobar la eficacia del bacteriófago BPECO19 en tres cepas de *E.coli* O157:H7 para eliminar biopelículas. Se cultivaron biopelículas de las 3 cepas en acero inoxidable, caucho y un dispositivo de concentración mínima de erradicación de biopelículas (MBECTM); y también en un medio biótico (lechuga) para comparar. Los resultados obtenidos muestran que la viabilidad de las bacterias adheridas se redujo un 3; 2,4 y 3,2 log(UFC/cm<sup>2</sup>) en las biopelículas en acero inoxidable, caucho y MBECTM, respectivamente; y en 2 log(UFC/cm<sup>2</sup>) en la lechuga. En conclusión, los resultados muestran que este fago es eficaz para reducir las biopelículas superficies abióticas y bióticas, pero en esta última muestran una menor eficacia debido a la influencia de diversos factores como las propias propiedades del producto fresco.

Las biopelículas causadas por *Staphylococcus aureus* suponen un problema en la industria alimentaria, por lo cual Cha et al. (2019) realizaron un estudio para ver el efecto de las endolisinas sobre ellas. Se utilizó la endolisina LysCSA13 del bacteriófago CSA13 de *S. aureus*. Los resultados muestran una reducción de un 80-90% de la biopelícula en poliestireno, vidrio y acero inoxidable.

En un estudio realizado por Gutiérrez et al. (2014) comprueban la eficacia de las endolisinas para la eliminación de biopelículas, en este caso se utiliza la endolisina LysH5 en biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Observaron reducciones entre 1 y 3 unidades logarítmicas con respecto al control.

### 5.3 Control postcosecha.

En la postcosecha, los fagos se aplican por el aumento de las enfermedades transmitidas por el consumo de los alimentos crudos y procesados (Bhardwaj et al., 2015), para así poder controlar las bacterias que provocan el deterioro de los alimentos como son los patógenos humanos durante el almacenamiento (Greer, 2005). Se aguarda que los fagos sean más eficaces en esta etapa que en la precosecha, porque los alimentos no se encuentran bajo las mismas condiciones que un animal vivo, el cual sufre las interacciones con el sistema inmunitario y los cambios de ambiente. Así mismo, también hay determinados factores que afectan a la aplicación de los fagos para encontrar su bacteria diana como las grasas, proteínas y carbohidratos (Goodridge & Bisha, 2011). En este caso, los bacteriófagos se aplican directamente al alimento para disminuir o eliminar completamente las bacterias patógenas; aunque en muchos casos los bacteriófagos ya se encuentran presentes en los alimentos deben aplicarse en la cantidad y lugar correctos (Bhardwaj et al., 2015).

Kuek et al. (2022) realizaron una revisión sobre un estudio en el que utilizaron el fago lítico de *Salmonella*, LPSE1, para reducir su población en la lechuga y se observó una reducción según la concentración aplicada.

Bigot et al. (2011) aislaron un fago (FWLLm1) de las heces de oveja que infecta cepas de *Listeria monocytogenes*. Se incorporaron los fagos a la superficie de una pechuga de pollo envasada al vacío lista para comer a una temperatura de 30°C y se produjo una disminución de 2,5 log(UFC/cm<sup>2</sup>) en la concentración del patógeno, pero luego se reanudó el crecimiento. Cambiando la temperatura a 5°C, temperatura de refrigeración, el rebrote de crecimiento se detiene hasta 21 días. En resumen, los datos muestran una rápida reducción del patógeno dependiente de la concentración de fagos, por lo cual, se necesita una alta concentración de fagos por unidad de superficie.

Seo et al. (2016) realizaron un estudio que tiene como finalidad inhibir *E. coli* O157:H7 en carne fresca contaminada artificialmente a temperatura de refrigeración. Para ello utilizaron el bacteriófago BPECO19, que es altamente lítico. Los resultados muestran que este bacteriófago disminuye la carga bacteriana *in vitro* dependiente de la multiplicidad de infección (MOI); se inhibió por completo *in vitro* en 10 minutos con un tratamiento de 10.000 MOI. Mientras

que BPECO19 a 100000 MOI en la carne de res y cerdo, tardo 4 y 8 horas respectivamente, con una reducción de 5 log(UFC/cm<sup>2</sup>).

#### 5.4 Bioconservantes.

Los bacteriófagos se utilizan para la bioconservación de los alimentos, que Singh (2018) define como el método para extender la vida útil de los alimentos. Aunque la preservación no supone una preocupación para la inocuidad de los alimentos, se considera que la vida útil se puede prolongar mediante la aplicación de los fagos en el control de los organismos descomponedores (Hudson et al., 2005).

En su revisión Hudson et al. (2005) recogen un estudio donde se usaron fagos para evitar el deterioro causado por *Brocothrix thermosphacta* en el tejido adiposo del cerdo. La vida útil se amplía de 4 días en las muestras control a 8 días cuando se aplicaron los fagos.

**Tabla 1:** Resumen de las aplicaciones de los fagos en la industria alimentaria.

Patógeno objetivo:	Fago o endolisina:	Momento del control:	Punto de aplicación:
<i>Campylobacter</i> spp.	CP8 y CP34	Precosecha	Pollo de engorde
	phiCcolBB35, phiCcolBB37, phiCcolBB12	Precosecha	Pollo de engorde
<i>E. coli</i> O157:H7	CEV1 y CEV2	Precosecha	Ovejas
	BPECO19	Postcosecha	Carne fresca
	BPECO19	Desinfección de superficies	Acero inoxidable, caucho y MBECTM
<i>Salmonella</i> sp.	LPSE1	Postcosecha	Lechuga
	PA13076 y PC2184	Bioconservación	Leche entera pasteurizada
<i>Listeria monocytogenes</i>	FWLLm1	Postcosecha	Pechuga de pollo
	LiMN4L, LiMN4p y LiMN17	Desinfección de superficies	Acero inoxidable
	LMP1, LMP7, FWLLM1 y FWLLM3	Bioconservación	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Endolisina LysCSA13	Desinfección de superficies	Poliestireno, vidrio y acero inoxidable
<i>Staphylococcus</i> Spp.	Endolisina LysH5	Desinfección de superficies	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>	RSL1	Precosecha	Planta de tomate

**Fuente:** Elaboración propia.

En la revisión realizada por Garvey (2022) sobre los bacteriófagos como agentes bioconservantes, demuestran como los fagos LMP1 y LMP7, y

FWLLM1 y FWLLM3 junto con una bacteriocina inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes* a temperaturas de refrigeración. Así mismo, los bacteriófagos PA13076 y PC2184 son eficaces para la inhibición de *Salmonella enteritidis* en leche entera pasteurizada a temperatura de refrigeración.

En la tabla 1 se presenta un resumen de las aplicaciones de los fagos en la industria alimentaria.

## **6. PREPARADOS COMERCIALES DE BACTERIÓFAGOS.**

Las enfermedades transmitidas por alimentos representan un riesgo para la salud en todo el mundo, debido a esto el número de bacteriófagos comerciales aprobados está aumentando progresivamente para su aplicación (Alomari et al., 2021).

Varias empresas han desarrollado preparados comerciales de fagos como Intralytix, empresa estadounidense, que ha desarrollado varios preparados (<https://www.intralytix.com/>): ListShield™ es una preparación natural de fagos contra *Listeria monocytogenes*, declarado aditivo alimentario por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos. SalmoFresh™ actúa contra la *Salmonella*, ShigaShield™ contra *Shigella* spp, EcoShield™ PX contra *E.coli* productora de toxina Shiga (STEC), incluidos O157:H7 y todos los serotipos de STEC y CampyShield contra *Campylobacter*. Todos son preparados naturales y declarados aditivos GRAS (Generalmente Reconocido como seguro) para su aplicación en los alimentos correspondientes a cada preparado.

Microcos Food Safety, con sede en Países Bajos, desarrollo el preparado Listex™ P100, que fue designado GRAS para su aplicación en la industria alimentaria. Listex P100 contiene el fago P100 contra *L. monocytogenes* (Bhardwaj et al., 2015). Además, también elaboraron un preparado contra *Salmonella* denominado PhageGuard S, el cual está clasificado como coadyuvante y catalogado con etiqueta limpia para alimentos procesados en países como Estados Unidos, la Unión Europea, Canadá, Australia, etc. Estos preparados de fagos se aplican diluidos por inmersión o pulverizado según el alimento o superficie (<https://phageguard.com/>).



El gran problema con las preparaciones de fago es la falta de reglas para su comercialización. En Estados Unidos, esto se puede hacer a través de la FDA de dos maneras: como aditivo alimentario o como GRAS, siendo la primera opción la más difícil de lograr ya que deben tener ciertas propiedades que no son aplicables a los bacteriófagos (Spricigo, 2012).

Así mismo, en la Unión Europea (UE), Listex™ P100 está disponible para su uso desde el año 2007 (Spricigo, 2012). En el caso de los preparados desarrollados en Países Bajos, como son coadyuvantes y su función es prevenir el crecimiento, su uso es seguro. Ante la ausencia de normativa específica en España y dado que su aplicación es segura, la empresa productora de los alimentos decide si utiliza estos preparados de fagos como complemento en los procesos de control microbiológico de los alimentos, sin llegar a sustituir otras formas de control de la contaminación (Bertó Navarro y Lorenzo, 2019).

### **6.1 Estudios sobre la aplicación de preparados comerciales de bacteriófagos.**

Gutiérrez et al. (2017) realizan un estudio comparativo de los preparados comerciales de fagos ListShield™ y Listex™ P100 que tienen como finalidad lidiar contra *L.monocytogenes* en la industria alimentaria. Se evaluó su capacidad para eliminar biopelículas formadas por dicha bacteria patógena y conservar el jamón curado de origen español. ListShield™, aplicado en una concentración más baja, lisa el 100% de las bacterias mientras que Listex™ P100, administrado en mayor dosis, elimina el 64%, esto es debido a que el primer preparado es un cóctel de seis fagos y tiene un mayor rango de huéspedes mientras el segundo es un solo fago. Aun así, los dos fueron eficaces en la eliminación de biopelículas a las 72 horas de su formación en superficies de acero inoxidable. En la bioconservación del jamón a 12°C y a 4°C se observó como Listex™ P100 disminuye el número de bacterias patógenas por debajo del límite de detección (<10 UFC/cm<sup>2</sup>) y ListShield™ mostro valores similares, a excepción de aquellas muestras que presentaban una elevada contaminación. La temperatura es otro factor a tener en cuenta debido a que a 12°C no controla el crecimiento del patógeno.

Zhang et al. (2019) quieren comprobar la eficacia del preparado SalmoFresh™ y compararlo con agua clorada para reducir la *Samonella* en productos

alimentarios. Realizan experimentos a diferentes temperaturas y tiempos de incubación y variando el método de aplicación sobre la lechuga, brotes de frijol mungo y semillas de frijol mungo (rociado e inmersión). Los resultados muestran una disminución en la lechuga y brotes de 0,76 y 0,83 log(UFC/cm<sup>2</sup>) cuando se rocía y una reducción de 2,43 y 2,16 log(UFC/cm<sup>2</sup>) en lechuga y brotes respectivamente cuando aplica la inmersión del producto en una solución de fagos. Por lo tanto, la mayor eficacia del preparado se produce cuando se sumerge el producto alimentario en una solución de fagos. Mientras que en las semillas este preparado no fue eficaz, debido a que no observaron reducciones de *Salmonella*. Así mismo, una aplicación previa de agua clorada a la solución de fagos es más eficaz para disminuir el patógeno.

Stratakos & Grant (2018) estudian los efectos antimicrobianos de intervenciones físicas, biológicas y naturales sobre *E. coli* en la carne cruda. En el tratamiento biológico, usaron el preparado EcoShield™ PX, que es un cóctel de bacteriófagos para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7. En las primeras 24 horas, los recuentos de la carne de res tratada con bacteriófagos a 4°C son más bajos que en la muestra control; mientras que las muestras tratadas y almacenadas a 12°C, la reducción es más pronunciada. Después de las 24 horas de almacenamiento, se redujo *E. coli* en 0,63 y 1,16 log(UFC/g) a la temperatura de 4°C y 12°C respectivamente. Por lo tanto, este preparado puede ser muy útil para tratar carne en la industria alimentaria.

## **7. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS BACTERIÓFAGOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.**

Los bacteriófagos se reconocen cada vez más como una alternativa para usar en las industrias alimentarias y evitar que el número de ETA aumente (Garvey, 2022) . Las ventajas que presenta su uso:

- Altamente específicos: permiten eliminar de forma selectiva las bacterias patógenas, y que las bacterias beneficiosas permanezcan de forma íntegra (Gutiérrez Fernández et al., 2020). Su consumo oral, incluso a elevadas concentraciones, es inocuo para los seres humanos (Hagens & Loessner, 2010).

- Capacidad para replicarse a bajas dosis en el sitio concreto de la infección, lo que facilita el proceso de eliminar las bacterias patógenas (Endersen et al., 2014).
- No altera las propiedades organolépticas de los alimentos (Garvey, 2022), es decir, el sabor, textura, olor y color de los alimentos (Endersen et al., 2014).
- El aislamiento de los bacteriófagos se caracteriza por ser rápido, simple y económico (Doss et al., 2017). Facilidad de manipulación genética (Barcenilla Canduela, 2019).
- Los fagos son ubicuos, se encuentran distribuidos por todo el planeta (Hagens & Loessner, 2010).
- Los bacteriófagos son resistentes a los factores de estrés durante el procesamiento de los alimentos (Alomari et al., 2021), los fagos pueden lisar las bacterias a temperaturas de 1°C, lo que es importante en la bioconservación de los alimentos (Greer, 2005)
- Certificado GRAS para su uso en la industria alimentaria (Endersen & Coffey, 2020). Su aplicación no provoca efectos secundarios ni reacciones alérgicas (Alomari et al., 2021).
- Los bacteriófagos y las endolisinas son efectivos contra las bacterias que presentan resistencia a antibióticos (Gutiérrez Fernández et al., 2020).

Sin embargo, los bacteriófagos presentan algunas desventajas, como:

- Las bacterias pueden desenvolver resistencia a los bacteriófagos (Gourkhede et al., 2020).
- Como consecuencia de la alta especificidad que presentan, tiene un rango de huéspedes pequeño (Alomari et al., 2021), por lo cual se necesitan cócteles de fagos (Barcenilla Canduela, 2019).
- Los bacteriófagos lisogénicos pueden transferir propiedades negativas, como genes de virulencia o de resistencia, por eso únicamente los fagos líticos son los que se deben utilizar en la industria alimentaria (Greer, 2005; Alomari et al., 2021).
- Las condiciones del alimento y del ambiente que hay en las industrias alimentarias, pueden inactivar o reducir su actividad, por lo tanto, es

necesario conocer las condiciones idóneas y aplicarlas para lograr la máxima eficacia (Gutiérrez Fernández et al., 2020).

A pesar de esto, estas desventajas no suponen un contratiempo debido a que es fácil rehacerse a ellas. La solución es usar un cóctel de fagos que presentan un amplio rango de huéspedes para superar los mecanismos de resistencia a los fagos comunes que tiene las bacterias, además es complicado que los mutantes espontáneos que presentan resistencia a los bacteriófagos influyan en el tratamiento (Kazi & Annapure, 2016).

En conclusión, para el biocontrol de los alimentos los fagos deben presentar las siguientes características: fagos líticos, amplio rango de huésped, carecer de genes que codifiquen para proteínas relacionadas con la virulencia o alérgicas, aprobación GRAS, estable en el periodo de almacenamiento y fácil de manipular para que sea económico producirlo en cantidades elevadas (Hagens & Loessner, 2010).

## **8. FACTORES QUE AFECTAN A LA EFICACIA DE LOS BACTERIÓFAGOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.**

El factor más importante para tener en cuenta a la hora de aplicar los bacteriófagos en la industria alimentaria es la matriz alimentaria, debido a que las interacciones de los componentes de los alimentos le proporcionan unas características fisicoquímicas a cada uno de ellos (forma del alimento), y estas pueden ser beneficiosas o no para los bacteriófagos. Los alimentos líquidos no suponen un problema ya que los bacteriófagos difunden libremente, pero en los alimentos sólidos depende de las propiedades de la superficie como la capacidad de adsorber los fagos y tener una completa accesibilidad a toda la superficie (Jorquera et al., 2015; Kawacka et al., 2020). Una solución a este problema es fijar los bacteriófagos, para ello se utilizan las diferencias de carga de las estructuras de los fagos, uniéndolos por la cabeza a una matriz alimentaria con carga positiva y dejando las colas sueltas para capturar su bacteria diana (Jorquera et al., 2015). Los alimentos donde la aplicación de los fagos es más complicada es aquellos que presentan una superficie grande e irregular como son las carnes, pescados o mariscos, debido a que tiene más complicado llegar a una bacteria diana (Kawacka et al., 2020).

Otro factor que puede alterar la eficacia de los bacteriófagos es la concentración de fagos que se aplica al alimento, el aumento de la concentración inicial del fago necesario en cada caso reduce las poblaciones bacterianas de una forma más efectiva (Kawacka et al., 2020). El momento en el que se aplican los fagos también está relacionado con la eficacia de estos, los bacteriófagos se deben aplicar durante o justo después de cortar el producto que se quiera tratar para que sean los más efectivos posible (Kawacka et al., 2020).

A los bacteriófagos les afecta el pH, su aplicación en alimentos con un pH bajo provoca que sean menos eficaces, como indica Kawacka et al. (2020). En general, los bacteriófagos suelen ser estables a pH entre 5 y 8, mientras que si se aplican bajas temperaturas el rango de pH puede extenderse entre 4 y 10 (Hudson et al., 2005). Leverentz et al. (2003) realizaron un estudio para ver como afectaba el pH a la aplicación de bacteriófagos contra *L. monocytogenes*, utilizando melón dulce (pH de 5,5 a 6,5) y manzanas (pH de 3,8 a 4,2). Los resultados muestran que con un pH superior a 5 se produce una mayor reducción de las poblaciones de las células patógenas.

La temperatura altera la actividad de los fagos, y esta depende del entorno en el que se encuentran. Usualmente, los bacteriófagos son más termoestables que la bacteria huésped (EFSA, 2009), y tienen su óptimo de temperatura a 37-40°C (Li et al., 2022). La inactivación térmica suele ocurrir en un rango de temperatura de 60-75°C, que provoca la descomposición de la cubierta proteica (Hudson et al., 2005; DiGIROLAMO et al., 1972). En la revisión de Hudson et al. (2005) recogen un estudio sobre la supervivencia del fago T4 en cangrejos, y se observó que tras pasar de una temperatura de 20 a 70°C en los primeros 5 minutos se produjo una disminución del 80% de los fagos. Hasta un 2,5% sobrevivieron durante un periodo de 20 minutos a temperaturas de 84°C.

La eficiencia de los fagos varía con la radiación ultravioleta, ya que la inactivación de los fagos con luz ultravioleta limita su supervivencia (Li et al., 2022), debido a que se produce daño en el ácido nucleico (Hudson et al., 2005). La presión y el choque osmótico producen una pérdida de la actividad de los bacteriófagos ya que se producen partículas fantasmas de bacteriófagos donde se pierde el ácido nucleico, y afecta a la capacidad de multiplicarse (EFSA, 2009).

Los bacteriófagos se inactivan ante la presencia de productos químicos antisépticos como el ácido peracético, etanol e hipoclorito de sodio. Así mismo, los bacteriófagos son más resistentes que las bacterias al estrés físico y químico, hay fagos que son resistentes al cloro (EFSA 2009). Sin embargo, el ácido peracético y el hipoclorito de sodio inactiva los fagos lácteos en un periodo corto de tiempo (5-10 min) (Hudson et al., 2005).

Otra causa afecta a la eficiencia de los fagos y ya es propio de ellos, es la multiplicidad de la infección, MOI, que es el número de viriones que se agregan por bacteria, donde a mayor MOI mayor lisis bacteriana se produce (Jorquera et al., 2015).

En la tabla 2 se muestra un resumen de los factores que afectan a la eficiencia de los bacteriófagos.

**Tabla 2:** Resumen de los factores que afectan a la eficiencia de los bacteriófagos.

<b>FACTORES QUE AFECTAN A LA EFECTIVIDAD DE LOS BACTERIÓFAGOS:</b>	
MATRIZ ALIMENTARIA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Afecta a los alimentos sólidos (capacidad de adsorber fagos y accesibilidad a toda la superficie).</li> <li>- Solución: Inmovilización fagos</li> </ul>
CONCENTRACIÓN DE FAGOS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentración inicial alta</li> </ul>
pH	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estables a pH 5-8</li> </ul>
TEMPERATURA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Óptimo: 37-40°C</li> <li>- Inactivación: 60-75°C</li> </ul>
RADIACIÓN UV	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Óptimo: baja.</li> </ul>
CHOQUE OSMÓTICO	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Partículas fantasmas de bacteriófagos, con pérdida de ac. nucleico</li> </ul>
PRODUCTOS QUÍMICOS ANTISÉPTICOS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inactivación por ácido peracético, etanol e hipoclorito de sodio.</li> </ul>
MOMENTO DE APLICACIÓN	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Durante o después del corte del alimento.</li> </ul>
MULTIPLICIDAD DE LA INFECCIÓN (MOI)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A mayor MOI, mayor lisis bacteriana.</li> </ul>

**Fuente:** Elaboración propia.

## 9. CONCLUSIÓN.

Las investigaciones realizadas muestran como los bacteriófagos pueden ser una alternativa eficaz para el biocontrol de patógenos alimentarios y así lograr la inocuidad alimentaria y, en consecuencia, disminuir la frecuencia de las enfermedades transmitidas por los alimentos.

Los estudios realizados hasta la actualidad demuestran que los bacteriófagos son eficaces como antibacterianos en los distintos puntos de la industria alimentaria, produciéndose grandes reducciones en el número de bacterias patógenas. Así mismo, las diferentes investigaciones tanto de fagos aislados como de preparados comerciales muestran que el empleo de un cóctel de fagos es más efectivo que usar un único fago individualmente. Las endolisinas también son eficaces a la hora de eliminar bacterias patógenas sobretodo en la desinfección de superficies que es donde su uso está más estudiado.

Por tanto, los bacteriófagos y las endolisinas pueden ser considerados una gran alternativa para su uso en la industria alimentaria y su aceptación pública es cada vez mayor, como se cita anteriormente ya se comercializan preparados de fagos.

Como posibles líneas de investigación, es necesario comprobar la ausencia de genes virulentos que pueden ser transferidos a los patógenos, optimizar el escalado industrial, asegurar la inocuidad de los bacteriófagos para el consumidor y la resistencia bacteriana a ellos.

Además, es importante establecer una normativa en la Unión Europea para el empleo de bacteriófagos en la industria alimentaria debido a que se carece de ella, mientras que en Estados Unidos si que existe y se realiza a través de la Administración de Alimentos y Medicamentos.

En conclusión, la utilización de los bacteriófagos junto con las endoslinas representa una alternativa en la industria alimentaria a los métodos tradicionales y a los antibióticos, que merece que su uso sea contemplado de manera firme ya que permite mantener la microbiota natural y beneficiosa de los alimentos debido a que solo elimina los patógenos indeseados, pero aun así se debe seguir estudiando para demostrar que su uso no supone un riesgo para la salud del consumidor y tener una mayor aceptación pública.

## **10. BIBLIOGRAFÍA.**

Alomari, M. M. M., Dec, M., & Urban-Chmiel, R. (2021). Bacteriophages as an Alternative Method for Control of Zoonotic and Foodborne Pathogens. *Viruses*, 13(12), 2348. <https://doi.org/10.3390/v13122348>

- Barcenilla Canduela, C. (2019). *Estrategias innovadoras de bioconservación en la industria alimentaria* [Trabajo de fin de máster, Universidad de Valladolid]. UVaDOC. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/38223>
- Bertó Navarro, R., & Lorenzo, F. (8 de noviembre de 2019). Condiciones de uso de los fagos para la reducción de niveles de patógenos en alimentos. BETELGEUX-CHRISTEYNS. <https://www.betelgeux.es/blog/2019/11/08/condiciones-de-uso-de-los-fagos-para-la-reduccion-de-niveles-de-patogenos-en-alimentos/>
- Bhardwaj, N., K. Bhardwa, S., Deep, A., Dahiya, S., & Kapoor, S. (2015). Lytic Bacteriophages as Biocontrol Agents of Foodborne Pathogens. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(11), 708-723. <https://doi.org/10.3923/ajava.2015.708.723>
- Bigot, B., Lee, W.-J., McIntyre, L., Wilson, T., Hudson, J. A., Billington, C., & Heinemann, J. A. (2011). Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage. *Food Microbiology*, 28(8), 1448-1452. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.07.001>
- Carvalho, C. M., Gannon, B. W., Halfhide, D. E., Santos, S. B., Hayes, C. M., Roe, J. M., & Azeredo, J. (2010). The *in vivo* efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC Microbiology*, 10(1), 232. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-232>
- Cha, Y., Son, B., & Ryu, S. (2019). Effective removal of staphylococcal biofilms on various food contact surfaces by *Staphylococcus aureus* phage endolysin LysCSA13. *Food Microbiology*, 84, 103245. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103245>
- DiGIROLAMO, R., Wiczynski, L., Daley, M., Miranda, F., & Viehweger, C. (1972). Uptake of Bacteriophage and Their Subsequent Survival in Edible West Coast Crabs After Processing. *APPL. MICROBIOL.*
- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., & Barekzi, N. (2017). A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. *Viruses*, 9(3), 50. <https://doi.org/10.3390/v9030050>
- European Food Safety Authority. (2009). The use and mode of action of bacteriophages in food production. *The EFSA Journal*, 7(5), 1076. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1076>



- European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. The EFSA Journal 20(12), e07666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- Endersen, L., & Coffey, A. (2020). The use of bacteriophages for food safety. *Current Opinion in Food Science*, 36, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.006>
- Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Phage Therapy in the Food Industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1), 327-349. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092415>
- Garvey, M. (2022). Bacteriophages and Food Production: Biocontrol and Bio-Preservation Options for Food Safety. *Antibiotics*, 11(10), 1324. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101324>
- Ge, H., Fu, S., Guo, H., Hu, M., Xu, Z., Zhou, X., Chen, X., & Jiao, X. (2022). Application and challenge of bacteriophage in the food protection. *International Journal of Food Microbiology*, 380, 109872. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109872>
- Gerstmans, H., Criel, B., & Briers, Y. (2018). Synthetic biology of modular endolysins. *Biotechnology Advances*, 36(3), 624-640. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.009>
- Goodridge, L. D., & Bisha, B. (2011). Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*, 1(3), 130-137. <https://doi.org/10.4161/bact.1.3.17629>
- Gourkhede, D., Wankhade, P., Ram, V., Kandhan, S., Sakhare, D., & Talokar, A. (2020). Application of Bacteriophages in Food Industry: A Review. *International Journal of Livestock Research*, 10(9), 1-7. <https://doi.org/10.5455/ijlr.20200506115451>
- Greer, G. G. (2005). Bacteriophage Control of Foodborne Bacteria. *Journal of Food Protection*, 68(5), 1102-1111. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.5.1102>
- 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*, 73B, 1474-1482.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.007>
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2016). Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Frontiers in Microbiology*, 7, 825.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00825>
- Gutiérrez, D., Ruas-Madiedo, P., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2014). Effective Removal of Staphylococcal Biofilms by the Endolysin LysH5. *PLoS ONE*, 9(9), e107307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107307>
- Gutiérrez Fernández, D., Fernández Llamas, L., Rodríguez González, A., & García Suárez, P. (2020). Bacteriófagos y endolisinas en la industria alimentaria. *Arbor*, 196(795), 544.  
<https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1008>
- Hagens, S., & Loessner, M. (2010). Bacteriophage for Biocontrol of Foodborne Pathogens: Calculations and Considerations. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 58-68.  
<https://doi.org/10.2174/138920110790725429>
- 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>
- Hudson, J. A., Billington, C., Carey-Smith, G., & Greening, G. (2005). Bacteriophages as Biocontrol Agents in Food. *Journal of Food Protection*, 68(2), 426-437. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.2.426>
- Jamal, M., Bukhari, S. M. A. U. S., Andleeb, S., Ali, M., Raza, S., Nawaz, M. A., Hussain, T., Rahman, S. u., & Shah, S. S. A. (2019). Bacteriophages: An overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *Journal of Basic Microbiology*, 59(2), 123-133.  
<https://doi.org/10.1002/jobm.201800412>
- Jorquera, D., Galarce, N., & Borie, C. (2015). 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>

- Kawacka, I., Olejnik-Schmidt, A., Schmidt, M., & Sip, A. (2020). Effectiveness of Phage-Based Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Food Products and Food Processing Environments. *Microorganisms*, 8(11), 1764. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111764>
- 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>
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., & Gutiérrez, G. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico: Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua*. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación.
- Kuek, M., McLean, S. K., & Palombo, E. A. (2022). Application of bacteriophages in food production and their potential as biocontrol agents in the organic farming industry. *Biological Control*, 165, 104817. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104817>
- Leverentz, B., Conway, W. S., Camp, M. J., Janisiewicz, W. J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., & Sulakvelidze, A. (2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut Produce by Treatment with Lytic Bacteriophages and a Bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4519-4526. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4519-4526.2003>
- Li, J., Zhao, F., Zhan, W., Li, Z., Zou, L., & Zhao, Q. (2022). Challenges for the application of bacteriophages as effective antibacterial agents in the food industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(2), 461-471. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11505>
- Loc Carrillo, C., Atterbury, R. J., El-Shibiny, A., Connerton, P. L., Dillon, E., Scott, A., & Connerton, I. F. (2005). Bacteriophage Therapy To Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6554-6563. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6554-6563.2005>
- Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage endolysins—Current state of research and applications. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), 480-487. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.002>

- Maura, D., & Debarbieux, L. (2011). Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(3), 851-859. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3227-1>
- Moye, Z., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses*, 10(4), 205. <https://doi.org/10.3390/v10040205>
- Organización Mundial de la Salud. (2015). Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria: Sinopsis. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/200047>
- Organización Mundial de la Salud. (2019). Primera conferencia internacional FAO/OMS/UA sobre inocuidad alimentaria: Addis Abeba, 12 y 13 de febrero de 2019: Resumen del presidente. <https://www.who.int/docs/default-source/resources/chairpersons-summary-addis-ababa-es.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (2020.) Inocuidad de los alimentos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, Md. F. R., & Ha, S.-D. (2017). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in Biofilms Using Bacteriophage BPECO 19: Phage control *E. coli* O157:H7 in biofilms.... *Journal of Food Science*, 82(6), 1433-1442. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13729>
- Schmelcher, M., Donovan, D. M., & Loessner, M. J. (2012). Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiology*, 7(10), 1147-1171. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.97>
- Schmelcher, M., & Loessner, M. J. (2016). Bacteriophage endolysins: Applications for food safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 76-87. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.10.005>
- Seo, J., Seo, D. J., Oh, H., Jeon, S. B., Oh, M.-H., & Choi, C. (2016). Inhibiting the Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Beef, Pork, and Chicken Meat using a Bacteriophage. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(2), 186-193. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.2.186>
- Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2017). Bacteriophages and its applications: An overview.

- Folia Microbiologica*, 62(1), 17-55. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0471-x>
- Sillankorva, S. M., Oliveira, H., & Azeredo, J. (2012). Bacteriophages and Their Role in Food Safety. *International Journal of Microbiology*, 2012, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2012/863945>
- Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation—A review. *Open Veterinary Journal*, 8(1), 104. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i1.16>
- Spricigo, D. A. (2012). *La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de Salmonella en alimentos* [Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona]. Dipòsit Digital de Documents de la UAB. <https://hdl.handle.net/10803/84011>
- Stratakos, A. C., & Grant, I. R. (2018). Evaluation of the efficacy of multiple physical, biological and natural antimicrobial interventions for control of pathogenic *Escherichia coli* on beef. *Food Microbiology*, 76, 209-218. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.011>
- Sulakvelidze, A. (2013). Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens: Bacteriophages and food safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3137-3146. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6222>
- Vikram, A., Callahan, M. T., Woolston, J. W., Sharma, M., & Sulakvelidze, A. (2022). Phage biocontrol for reducing bacterial foodborne pathogens in produce and other foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 78, 102805. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102805>
- Wang, Z., & Zhao, X. (2022). The application and research progress of bacteriophages in food safety. *Journal of Applied Microbiology*, 133(4), 2137-2147. <https://doi.org/10.1111/jam.15555>
- Zhang, X., Niu, Y. D., Nan, Y., Stanford, K., Holley, R., McAllister, T., & Narváez-Bravo, C. (2019). SalmoFresh™ effectiveness in controlling *Salmonella* on romaine lettuce, mung bean sprouts and seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108250. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108250>