



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

Aislamiento y aplicación de bacteriófagos como alternativa antimicrobiana contra patógenos transmitidos por carne de res

Isolation and application of bacteriophages as an antimicrobial alternative against beef-borne pathogens

García-Ponce, R.¹, Hernández-Escareño, J.J.², Espinosa-Carranza, N.N.¹, Villarreal-Villarreal, J.P.², Hernández-Vidal, G.^{2*}

¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, C.P. 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, C.P. 66054, General Escobedo, Nuevo León, México.

qbpromario@gmail.com; jjescareno@hotmail.com; nancy.espinosah@gmail.com; pablo.villarrealvl@uanl.edu.mx; gustavo.hernandezh@uanl.mx*

Innovación tecnológica: Alternativa sostenible contra patógenos transmitidos por cárnicos.

Área de aplicación industrial: Industria Alimentaria.

Recibido: 28 agosto 2024

Aceptado: 16 enero 2025

Abstract

Meat products are widely consumed worldwide. During their production chain, they can be contaminated by pathogens such as *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*, which cause serious and, in some cases, fatal infections. The limitations of conventional disinfection methods, together with the increasing resistance to antibiotics, underline the need for effective and economical alternatives. In this context, the use of phages as antimicrobial agents emerges as a promising solution. In this study, phages specific against strains of *E. coli* (ATCC 25922, 15597, 35401, O157:H7 ATCC 43888) and *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311) were obtained from water samples from a local wastewater treatment plant. Nineteen bacteriophages were isolated for *E. coli* strains, of which the *E. coli* strain ATCC 25922 showed higher susceptibility to the action of phages present in the water samples, while the strain ATCC 43888 showed high resistance. In the case of *S. Typhimurium*, only one phage (ϕ 101) was

isolated and evaluated against 30 clinical isolates of *Salmonella* spp., in which it showed lytic activity in 16. This same phage was used to reduce the bacterial load on a stainless-steel surface contaminated by *S. Typhimurium*, achieving a significant decrease after 24 hours. The results of this study highlight the potential antimicrobial activity of bacteriophages against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant strains, as well as their use as surface disinfectants. These findings suggest that the use of phages could represent an effective alternative for the treatment of pathogens transmitted by meat products.

Keywords: Bacteriophages, Antimicrobials, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*.

Resumen

Los productos cárnicos son ampliamente consumidos en todo el mundo. Durante su cadena de producción, pueden ser contaminados por patógenos como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* y *Escherichia coli*, los cuales causan infecciones graves y, en algunos casos, mortales. Las limitaciones de los métodos convencionales de desinfección, junto con la creciente resistencia a los antibióticos, subrayan la necesidad de alternativas eficaces y económicas. En este contexto, el uso de fagos como agentes antimicrobianos surge como una solución prometedora. En este estudio, se obtuvieron fagos específicos contra cepas de *E. coli* (ATCC 25922, 15597, 35401, O157:H7 ATCC 43888) y de *Salmonella Typhimurium* (ATCC 13311), a partir de muestras de agua de una planta local de tratamiento de aguas residuales. Se aislaron 19 bacteriófagos para las cepas de *E. coli* de las cuales la cepa de *E. coli* ATCC 25922 mostró mayor susceptibilidad a la acción de los fagos presentes en las muestras de agua, mientras que la cepa ATCC 43888 mostró gran resistencia. Para el caso de *S. Typhimurium* se aisló únicamente un fago ($\phi 101$) el cual se evaluó contra 30 aislados clínicos de *Salmonella* spp., en los cuales mostró actividad lítica en 16. Este mismo fago se utilizó para reducir la carga bacteriana en una superficie contaminada de acero inoxidable por *S. Typhimurium*, logrando una disminución significativa a las 24 horas. Los resultados de este estudio destacan la potencial actividad antimicrobiana de los bacteriófagos contra cepas susceptibles y resistentes a antibióticos, así como su uso como desinfectantes de superficies. Estos hallazgos sugieren que el uso de fagos podría representar una alternativa eficaz para el tratamiento de patógenos transmitidos por productos cárnicos.

Palabras clave: Bacteriófagos, Antimicrobianos, *Escherichia coli*, *Salmonella* entérica.

1. Introducción

El consumo de carne de res a nivel mundial ha presentado una tasa de crecimiento. En México en el 2022, la producción de carne de res se ubicó en 2.1 millones de toneladas de las cuales 322 mil toneladas se destinaron para exportación, lo que equivale al 15.33% de la producción nacional (SADER, 2022).

Estos datos demuestran el alto consumo de carne de res en México, por lo cual las enfermedades transmitidas por dichos alimentos representan un riesgo para los consumidores.

Una gran diversidad de bacterias patógenas han sido implicadas en brotes de

enfermedades transmitidas por alimentos en todo el mundo (CDC, 2023). En países en desarrollo como México, los principales patógenos reportados son: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y diferentes patotipos de *Escherichia coli* (Cruz-Galvez *et al.*, 2013). Particularmente, la contaminación por *Salmonella* spp. y *E. coli* son patógenos muy frecuentes en la carne vacuna y sus derivados; debido a las deficiencias sanitarias durante el sacrificio y eviscerado para la obtención de la canal (Stanley *et al.*, 2017; Obaidat, 2020; Garza-García *et al.*, 2020; Delgado-Suárez *et al.*, 2021).

Las infecciones intestinales en humanos ocasionadas por *Salmonella* spp. y los distintos patotipos de *E. coli* representan una problemática de salud pública global (WHO, 2007). Los síntomas típicos de dichas infecciones pueden variar desde diarreas leves hasta colitis hemorrágicas que en algunos casos pueden llegar a ocasionar la muerte de los pacientes infectados (Geletu *et al.*, 2022).

Los métodos físicos, químicos y biológicos que se utilizan para impedir la contaminación de alimentos con dichos patógenos presentan varios desafíos ya que pueden provocar oxidación de lípidos, inducción de olores desagradables, favorecer la resistencia antimicrobiana, cambios de color y textura, pérdida de nutrientes, problemas de aceptación por los clientes, además, de representar un peligro para la salud ya que pueden formar compuestos cancerígenos (Richardson, 2003; Ahn *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012; Maherani *et al.*, 2016; Mittendorfer, 2016).

Este escenario necesita con urgencia la búsqueda de alternativas antimicrobianas para controlar agentes patógenos transmitidos por alimentos, en este contexto, la aplicación de los bacteriófagos en la industria

alimentaria ha sido cada vez más reconocida. Estos virus bacterianos presentan diversas características aplicables al control de microorganismos patógenos ya que ocasionan lisis específica en bacterias y no afectan a células de humanos y animales, además, pueden atacar cepas resistentes a los antibióticos y su presencia es abundante en el medio ambiente (Pereira *et al.*, 2021; Minh *et al.*, 2016).

Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo aislar bacteriófagos de muestras de agua de una planta tratadora y evaluar su virulencia contra *E. coli* y *S. Typhimurium* para ser propuestos como una alternativa antibacteriana para el tratamiento y descontaminación de patógenos transmitidos por productos cárnicos.

2. Materiales y métodos

2.1. Lugares de trabajo

El análisis microbiológico y procesamiento de las muestras de agua para el aislamiento de los fagos se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Las muestras de agua residual y tratada fueron proporcionadas por la planta tratadora de aguas “Monterrey” ubicada en el municipio de Escobedo, Nuevo León.

2.2. Controles positivos y cepas bacterianas

Se utilizaron los fagos: MS2 para *E. coli* y el fago PRD1 para *S. Typhimurium* como controles positivos, los cuales fueron proporcionados por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Además, se utilizaron las cepas de *E. coli* ATCC 25922, 15597, 35401, O157:H7 ATCC 43888 y *S. Typhimurium* ATCC 13311 otorgadas por el Laboratorio de

Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL.

2.3. Aislamiento de bacteriófagos

Se recolectaron 350 ml de agua residual y tratada de diferentes puntos de la planta tratadora de aguas, la transportación al laboratorio se realizó con refrigerantes y su procesamiento no excedió el tiempo de 6 horas desde su recolección. Los fagos fueron aislados a partir de agua negra (M1), reactor biológico (M2), efluentes (M3) y agua para venta (M4). El aislamiento se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Jamalludeen *et al.*, (2007).

Se realizaron cultivos bacterianos de las cepas mencionadas en el apartado 2.2 en tubos con caldo soya triptica (CST) (Bioxon) a 37 °C en agitación continua a 150 RPM por 24 horas. Posteriormente, 1 ml de cada cultivo se transfirió a un tubo con 30 ml de CST y se incubó a las mismas condiciones durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo se determinó la fase logarítmica 10^6 , seguido de esto se mezcló con los tratamientos (Gaviria & Castaño, 2012). Posteriormente, se tomaron 200 ml de cada muestra de agua (M1, M2, M3 y M4) y se aforaron a 1,000 ml de una solución que contenía triptona (1%) y cloruro de sodio (0.25%). Después de esto se tomaron 20 ml de estas soluciones y se mezclaron con 20 ml del cultivo bacteriano, se incubaron a 37 °C en agitación continua a 120 RPM por 24 horas (cada muestra de agua se procesó por separado). Al término de la incubación las muestras fueron centrifugadas a 4000 RPM durante 15 min. Se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de una membrana milipore de 0.45 μm estéril, cada filtrado fue almacenado a 4 °C.

2.4. Prueba de desafío contra bacterias

Los filtrados de las muestras de agua colectadas (M1, M2, M3 y M4) fueron

desafiados por triplicado contra cepas de *E. coli* ATCC 25922, 15597, 35401, O157:H7 ATCC 43888 y *S. Typhimurium* (ATCC 13311), por el método de doble capa. Para dicha técnica se utilizaron placas de agar soya triptica (AST). Para la segunda capa se utilizó agar suave, el cual se preparó agregando 6.5 g/L de agar bacteriológico en caldo infusión cerebro corazón (ICC).

Las cepas de *E. coli* ATCC 25922, 15597, 35401, O157:H7 ATCC 43888 se activaron en caldo ICC, para después mezclar 200 μl del cultivo bacteriano y 100 μl de los filtrados de muestra de agua (M1, M2, M3 y M4) en tubos que contenían 7 ml de agar suave. Posteriormente se transfirieron a placas de AST y se incubaron a 37 °C por 6 horas para su posterior análisis y observación de placas líticas. Se consideró al bacteriófago muy virulento cuando mostro más de un 75% de placas líticas y medianamente virulento cuando las placas líticas se observaron entre el 45 y 75 %.

Para la purificación y conservación de los bacteriófagos, se repitió el mismo procedimiento y una vez que se observaron las placas líticas se tomó la capa de agar suave y se homogenizó en solución salina al 0.85% estéril y se centrifugó a 4000 RPM durante 10 min. Los sobrenadantes se filtraron y se almacenaron a 4 °C. Este procedimiento se hizo con cada una de las muestras positivas a placas líticas para formación de stock de fagos.

2.5. Prueba de fagotipificación

De los bacteriófagos obtenidos se tomó un fago específico contra *S. Typhimurium* (ATCC 13311) y se realizó un análisis de tipificación mediante la técnica de doble capa sobre 30 cepas de aislados clínicos de *Salmonella spp.* proporcionadas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL. Además,

dicho fago ($\phi 101$) se desafi  contra bacterias de diferentes géneros para determinar su nivel de especificidad. Para este ensayo se utilizaron cepas de *Serratia marcescens*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* ATCC 25922, 15597, 35401, O157:H7 ATCC 43888 proporcionadas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

2.6. Prueba de desinfección de superficies

Se realizó un ensayo de desinfección de superficie contaminada por *S. Typhimurium* (ATCC 13311) con el uso del fago específico $\phi 101$. Para este ensayo se utilizó una superficie de acero inoxidable desinfectada con alcohol al 70% y radiación ultravioleta durante 15 minutos a temperatura de 20  C. Dicha superficie fue dividida en 28 cuadrantes de 100 cm² delimitados por hielo seco (Figura 1). Los cuadrantes se dividieron en 7 grupos de cuatro espacios (2 controles positivos y 2 tratamiento).

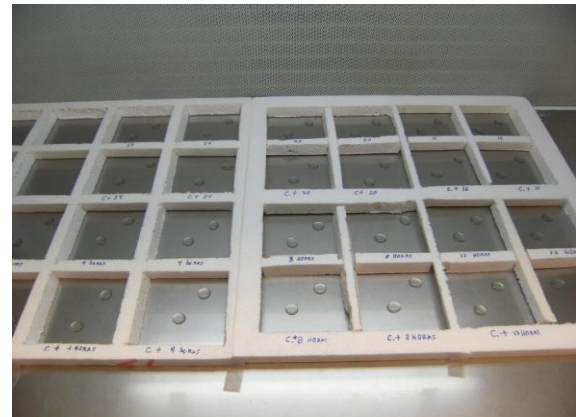


Figura 1. Superficie de acero CONTAMINADA con *S. Typhimurium*.

En cada cuadrante experimental, se aplicó 1 ml que contenía 1.2×10^8 células/ml de *S. Typhimurium* (ATCC 13311) y 400 μ l del fago $\phi 101$ (9×10^9 UFP/ml) distribuyéndose de manera uniforme por toda la superficie del cuadrante con un hisopo estéril. Posterior a ello, se realizó el monitoreo de las bacterias mediante el método de cuenta viable en placa a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas, con el fin de evaluar la reducción de la carga bacteriana.

3. Resultados y discusión

3.1. Aislamiento de bacteriófagos y desafío contra bacterias

Se aislaron y purificaron 19 bacteriófagos para las diferentes cepas de *E. coli* y un solo fago para la cepa de *S. Typhimurium*. En la Tabla 1, se muestra los resultados de fagos aislados para cada cepa bacteriana y su denominación para la formación de stock.

Tabla 1. Características de los fagos aislados.

Fago	Origen	Cepa	Virulencia
$\phi C5$	M1	<i>E. coli</i> 25922	++
$\phi fmvz$	M2	<i>E. coli</i> 25922	+++
ϕR	M1	<i>E. coli</i> 25922	+++
$\phi 102$	M2	<i>E. coli</i> 25922	+++
$\phi 110$	M2	<i>E. coli</i> 25922	+++
ϕMB	M2	<i>E. coli</i> 25922	++
$\phi 8$	M3	<i>E. coli</i> 25922	+++
$\phi 7$	M4	<i>E. coli</i> 25922	+++
$\phi 21$	M1	<i>E. coli</i> 15597	++

φ12	M1	<i>E. coli</i> 15597	++
φ27	M2	<i>E. coli</i> 15597	++
φ31	M2	<i>E. coli</i> 15597	+++
φ23	M3	<i>E. coli</i> 15597	++
φ25	M4	<i>E. coli</i> 15597	+++
φ58	M1	<i>E. coli</i> 35401	++
φ28	M2	<i>E. coli</i> 35401	++
φ22	M3	<i>E. coli</i> 35401	++
φ26	M4	<i>E. coli</i> 35401	++
φYEMS	M1	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43888	++
φ101	M1	<i>S. Typhimurium</i>	+++

+++ : Muy virulento, ++ : Medianamente virulento, M1: Agua negra, M2: Reactor biológico, M3: Efluentes, M4: Agua para venta

La cepa de *E. coli* ATCC 25922 mostró mayor susceptibilidad (>75% de placas líticas) a la acción de los fagos aislados de todas las muestras de agua, mientras que la cepa O157:H7 ATCC 43888 mostró gran resistencia (<50% de placas líticas) observándose pocas placas líticas para los fagos aislados de las diferentes muestras de agua. Para *S. Typhimurium* (ATCC 13311) solo se logró recuperar un fago específico el cual se denominó “fago φ101”.

Estudios previos han demostrado la presencia de bacteriófagos en aguas residuales de hospitales y de plantas tratadoras de aguas, los cuales tienen la capacidad de lisar bacterias multirresistentes a los antibióticos (Kang et al., 2024; Wang et al., 2024). Esta alternativa puede ser una solución para el control de contaminación por microorganismos patógenos presentes en la cadena de producción de productos cárnicos. Además, se considera que puede ayudar a minimizar el impacto sobre los ecosistemas y la salud pública (Azzam et al., 2024).

3.2. Prueba de fagotipificación

Para este ensayo se evaluó únicamente el bacteriófago φ101 específico para *S. Typhimurium* contra 30 aislados de *Salmonella* spp. provenientes del Hospital Universitario, con la finalidad utilizar los

fagos como herramienta de identificación, de los cuales el 53.33% de los aislados clínicos fueron fagotipificables con el fago φ101.

La evaluación contra bacteria de diferentes géneros para determinar el nivel de especificidad del fago φ101, mostró que fue negativo a todos los desafíos con los géneros bacterianos expuestos. Esto demuestra la especificidad del fago φ101 por las cepas de *Salmonella* spp. con la posibilidad de causar lisis solo en la serovariedad *S. Typhimurium*. En un estudio realizado por Choi *et al.* (2024) mencionan la existencia de bacteriófagos específicos contra *S. Typhimurium* multirresistente, demostrando un impacto ambiental potencial como sustancia para la prevención de este patógeno en varios aspectos de la cadena de la industria porcina.

3.3. Prueba de desinfección de superficies

Se observó el efecto de desinfección del fago φ101 en la superficie de acero inoxidable mediante la disminución considerable de la carga bacteriana al transcurso de las horas, obteniendo 3×10^2 UFC/ml a las 24 horas (Tabla 2). Esto demuestra su capacidad como alternativas antimicrobianas para controlar dichos patógenos, que pueden ser contaminación en diferentes puntos de la cadena de producción de productos cárnicos.

Tabla 2. Reducción de UFC de *S. Typhimurium* por el fago $\phi 101$ en superficies contaminadas.

Hora	UFC/ml
0	1.2×10^8
4	1.4×10^6
8	6×10^3
12	2×10^3
16	1×10^3
20	6×10^2
24	3×10^2

UFC: Unidades formadoras de colonias.

Algunas investigaciones han demostrado la aplicación de los bacteriófagos aislados de agua de río y aguas residuales demostrando ser líticos contra cepas de *E. coli* y *S. Typhimurium* multirresistentes a los antibióticos (Jamalludeen *et al.*, 2007; Elbahnasawy *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2019; Petsong *et al.*, 2019). El uso de los fagos tiene gran relevancia en la industria de los alimentos cárnicos, ya que se ha demostrado que pueden ser aplicados como desinfectantes de superficies contra bacterias patógenas con actividad antimicrobiana y antibiofilm. Además, se considera que la combinación de fagos específicos y desinfectantes químicos tiene mayor efecto para eliminar biopelículas bacterianas y eliminar bacterias en superficies duras (Chen *et al.*, 2024; Brás *et al.*, 2024; Byun *et al.*, 2024).

4. Conclusión

De manera general, este estudio preliminar sugiere que el aislamiento y aplicación de los fagos, pueden ser utilizados para controlar microorganismos patógenos que ocasionan contaminación en la cadena de producción de productos cárnicos incluyendo la desinfección de superficies. Adicionalmente presentan la capacidad de afectar bacterias resistentes a antibióticos por lo cual podrían considerarse una alternativa para disminuir el uso de los antibióticos y por lo tanto disminuir el fenómeno de resistencia.

5. Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses, en relación con la

elaboración, revisión y publicación de este trabajo.

6. Referencias

1. SADER. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (2022). Escenario mensual de productos agroalimentarios. Servicio de Informacion Agroalimentaria Y Pesquera. Mexico.
<https://www.gob.mx/siap/prensa/reporte-mensual-de-escenarios-de-13-productos-agroalimentarios?idiom=es>
2. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. (2023). Foodborne Germs and Illnesses. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED).
<https://www.cdc.gov/ncezid/divisions-offices/about-dfwed.html>
3. Cruz-Galvez, A. M., Gómez-Aldapa, C. A., Villagómez-Ibarra, J. R., Chavarría-Hernández, N., Rodríguez-Baños, J., Rangel-Vargas, E., & Castro-Rosas, J. (2013). Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central Mexico: Studies in vitro and in raw beef. *Food Control* ;32(1):289-295. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.018>
4. Stanley, P. L., Winslow, T. A. & Pillay, I. (2017). Detection of Presumptive Pathogens in Ground Beef from Supermarket and Farmers' Market Sources. *Georgia Journal of Science* 2017;75(2):2. Available at:

<https://digitalcommons.gaacademy.org/gjs/vol75/iss2/2>

5. Obaidat, M. M. (2020). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157: H7 in imported beef cattle in Jordan. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 70:101447. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101447>

6. Garza-García, J. A. D. L., Rubio Lozano, M. S., Wachter-Rodarte, M. D. C., Navarro Ocaña, A., Hernández-Castro, R., Xicohtencatl-Cortes, J., & Delgado Suárez, E. J. (2020). Frecuencia de contaminación y de serotipos de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* en una operación integrada de matanza y deshuese de bovinos. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. 11(4):971-990. DOI:

<https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5111>

7. Delgado-Suárez, E. J., Palós-Guitérrez, T., Ruíz-López, F. A., Hernández Pérez, C. F., Ballesteros-Nova, N. E., Soberanis-Ramos, O., Méndez-Medina, R. D., Allard, M. W., & Rubio-Lozano, M. S. (2021). Genomic surveillance of antimicrobial resistance shows cattle and poultry are a moderate source of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella* in Mexico. *PLoS One*. 16(5):e0243681. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243681>

8. WHO. World Health Organization. (2023). Estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Available in: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565165>

9. Geletu, U. S., Usmael, M. A., & Ibrahim, A. M. (2022). Isolation, identification, and susceptibility profile of *E. coli*, *Salmonella*, and *S. aureus* in dairy farm and their public health implication in Central Ethiopia. *Veterinary Medicine*

International. 2022(1), 1887977. <https://doi.org/10.1155/2022/1887977>

10. Richardson, S. D. (2003). Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 22(10):666-684. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01003-3](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01003-3)

11. Ahn, D. U., & Lee, E. J. (2012). Mechanisms and prevention of quality changes in meat by irradiation. *Food irradiation research and technology*. 58:209-226. DOI:

<https://doi.org/10.1002/9781118422557.ch12>

12. Chen, J. H., Ren, Y., Seow, J., Liu, T., Bang, W. S., & Yuk, H. G. (2012). Intervention technologies for ensuring microbiological safety of meat: current and future trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 11(2):119-132. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00177.x>

13. Maherani, B., Hossain, F., Criado, P., Ben-Fadhel, Y., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2016). World market development and consumer acceptance of irradiation technology. *Foods*. 5(4):79. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods5040079>

14. Mittendorfer, J. (2016). Food irradiation facilities: Requirements and technical aspects. *Radiation Physics and Chemistry*. 129:61-63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.08.007>

15. Pereira, C., Costa, P., Duarte, J., Balcão, V. M., & Almeida, A. (2021). Phage therapy as a potential approach in the biocontrol of pathogenic bacteria associated with shellfish consumption. *International Journal of Food Microbiology*. 338:108995. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108995>

16. Minh, D. H., Minh, S. H., Honjoh, K. I., & Miyamoto, T. (2016). Isolation and biocontrol of Extended Spectrum Beta-

Lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* contamination in raw chicken meat by using lytic bacteriophages. *LWT-Food Science and Technology*, 71:339-346. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.013>

17. Jamalludeen, N., Johnson, R. P., Friendship, R., Kropinski, A. M., Lingohr, E. J., & Gyles, C. L. (2007). Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary microbiology*. 124(1-2):47-57. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.028>

18. Gaviria, G., & Castaño, J. (2012). Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para *Escherichia coli* DH5α a partir de aguas residuales. *Revista MVZ Córdoba*. 17(1):2852-2860. DOI:

<https://doi.org/10.21897/rmvz.253>

19. Kang, Y., Wang, J., Zhu, C., & Li, Z. (2024). Unveiling the Genomic Diversity and Ecological Impact of Phage Communities in Hospital Wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 135353. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.135353>

20. Wang, D., Liu, L., Xu, X., Wang, C., Wang, Y., Deng, Y., y Zhang, T. (2024). Distributions, interactions, and dynamics of prokaryotes and phages in a hybrid biological wastewater treatment system. *Microbiome*. 12 (1), 134. DOI:

<https://doi.org/10.1186/s40168-024-01853-6>

21. Azzam, M. I., ElSayed, E. E., Gado, M. M., & Korayem, A. S. (2024). New phage-based wastewater pollution control solution with safe reuse. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. 21, 100951. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2024.100951>

22. Choi, Y., Kwak, M. J., Kang, M. G., Kang, A. N., Lee, W., Mun, D., Choi, H., Jeongkuk, P., Eor, J. Y., Song, M., Kim, J. N., Oh, S., & Kim, Y. (2024). Molecular characterization and environmental impact of newly isolated lytic phage SLAM_phiST1N3 in the Cornellvirus genus for biocontrol of a

multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* in the swine industry chain. *Science of The Total Environment*, 922, 171208. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171208>

23. Elbahnasawy, M. A., ElSayed, E. E., & Azzam, M. I. (2021). Newly isolated coliphages for bio-controlling multidrug-resistant *Escherichia coli* strains. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. 16:100542. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100542>

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

<https://doi.org/10.3390/microorganisms7040094>

25. Petsong, K., Benjakul, S., Chaturongakul, S., Switt, A. I. M., & Vongkamjan, K. (2024). Lysis profiles of *Salmonella* phages on *Salmonella* isolates from various sources and efficiency of a phage cocktail against *S. enteritidis* and *S. typhimurium*. *Microorganisms*. 7(4):100. DOI:

<https://doi.org/10.3390/microorganisms7040100>

26. Chen, Z., Yang, Y., Li, G., Huang, Y., Luo, Y., & Le, S. (2024). Effective elimination of bacteria on hard surfaces by the combined use of bacteriophages and chemical disinfectants. *Microbiology Spectrum*. 12(4), e03797-23. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.03797-23>

27. Brás, A., Braz, M., Martinho, I., Duarte, J., Pereira, C., & Almeida, A. (2024). Effect of bacteriophages against *Escherichia coli* biofilms on food processing surfaces. *Microorganisms*, 12 (2), 366. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020366>

28. Byun, K. H., Han, S. H., Choi, M. W., Kim, B. H., & Ha, S. D. (2024). Efficacy of

disinfectant and bacteriophage mixture against planktonic and biofilm state of *Listeria monocytogenes* to control in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 413, 110587. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110587>