

Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos

Bacteriophages for control of bacterial pathogens in foods

RIALA6/1270

Lívia Pícolo Ramos ROSSI^{1*}, Rogeria Comastri de Castro ALMEIDA²

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano - IFBAIANO, *Campus* Catu-BA, 1ª Trav. Arnaldo Lopes da Silva, 74, apto 1103 - Edf. Mar Caribe - Bairro: Stiep - CEP: 41770-160 Salvador-BA, Brasil, Tel.: (71) 3342-2552 (71) 9981-9112 - e-mail: liviapr@hotmail.com

²Universidade Federal da Bahia, Escola de Nutrição, Departamento de Ciência dos Alimentos

Recebido: 30.10.2009 – Aceito para publicação: 03.05.2010

RESUMO

Nos últimos anos, um grande número de estratégias para minimizar a contaminação microbiana de alimentos tem sido explorado. Problemas com aceitabilidade e alteração nas características organolépticas dos alimentos, decorrentes de tratamentos físicos como o emprego do calor e da luz ultravioleta, têm sido descritos. Além disso, os consumidores estão buscando cada vez mais os alimentos naturais, isto é, isentos de conservantes químicos. Uma abordagem que tem sido objeto de interesse crescente é a utilização de bacteriófagos, que são vírus que infectam e matam as bactérias. Os bacteriófagos são componentes da microbiota natural da produção de alimentos, desde o campo até a comercialização; são estáveis nesses ambientes e são prontamente recuperados do solo, da água, de efluentes, das fezes e dos próprios alimentos. Os estudos para o controle de micro-organismos patogênicos em alimentos com o uso de bacteriófagos são promissores, mas ainda necessitam ser aperfeiçoados. O sucesso dessa metodologia dependerá da aceitação do consumidor dentre outros fatores. Por esta razão, é prudente considerar cuidadosamente a fonte de qualquer bacteriófago antes deste ser aplicado nos alimentos.

Palavras-chave. bacteriófago, bactérias patogênicas, alimentos.

ABSTRACT

Over the last few years, a number of strategies to minimize the microbial load in raw products have been explored. Problems with the acceptability and deterioration of organoleptic properties have been described after physical treatments such as steam, dry heat and UV light. Moreover, consumers are looking for more natural foods, i.e. free from chemical preservatives. An approach that has been the object of growing interest is the use of bacteriophages, which are viruses that infect and kill bacteria. Bacteriophages are components of the natural microflora in the food production continuum from the farm to the retail outlet; they are stable in these environments and are readily recovered from soil, sewage, water, farm and processing plant effluents, feces, and retail foods. Studies on pathogens control in foods by using bacteriophage are promising, however they have to be improved. The success of this methodology will depend on the consumer's acceptance. In this way, it is recommended to carefully consider the origin of the phage before introducing it into foods.

Key words. bacteriophages, bacterial pathogens, foods.

INTRODUÇÃO

Bacteriófagos são vírus que invadem a célula bacteriana e, no caso de fagos líticos, destroem o metabolismo bacteriano e levam à lise celular da bactéria¹. Possuem atributos que são atrativos para aqueles que buscam novos modos para controlar os patógenos de origem alimentar e micro-organismos deterioradores². São as unidades mais abundantes de autorreplicação no ambiente, e estão presentes em quantidades significativas na água e nos mais diversos tipos de alimentos, particularmente nos fermentados³. Além do mais, os fagos também são organismos comensais normais do homem e dos animais, e são abundantes, especialmente no trato gastrointestinal⁴.

Com o advento dos antibióticos, as pesquisas envolvendo fagos foram abandonadas na maioria dos países do ocidente⁵. Entretanto, mesmo que lentamente, as pesquisas estão sendo retomadas e alguns estudos^{2,3,6} resumem o *status* atual do uso de fagos para o controle de bactérias indesejáveis, exceto em terapia de doenças em humanos e animais. O potencial dos fagos para controle de patógenos de origem alimentar é citado em estudos com *Salmonella* spp.⁷⁻¹¹, *Campylobacter* spp.^{7,12}, *Campylobacter jejuni*¹³, *Escherichia coli*^{14,15} e *Listeria monocytogenes*^{12,16,17,18}.

Bacteriófagos como agentes antimicrobianos

Em 1915, Frederick W. Twort, na Inglaterra publicou uma nota descrevendo a destruição infecciosa de colônias de micrococcos por um agente que parecia ser viral porque atravessava os filtros que retinham bactérias. Estes eram inativados por aquecimento a 60°C durante 1 hora e não podiam proliferar de forma autônoma. Em 1917, Felix d'Herelle, no Instituto Pasteur, em Paris, estudou o fenômeno de maneira independente e demonstrou a natureza da partícula o qual denominou de *bacteriófago*, que significa "comedor de bactérias"^{10,19}. A partir destas observações o fenômeno foi denominado *fenômeno Twort-d'Herelle*^{10,19}. E, na década de 1930, o caráter viral do bacteriófago foi confirmado pelo trabalho de Burnet e de Schlsinger^{10,19}.

Como todos os vírus, os bacteriófagos são compostos de DNA ou RNA recobertos por uma capa de proteína chamada capsídeo. O ácido nucleico pode ser de fita simples ou dupla e em alguns bacteriófagos o capsídeo é coberto por uma cauda contendo lipídios que

desempenham, provavelmente, a função da aderência do bacteriófago à parede das células hospedeiras. Muitos bacteriófagos possuem elementos estruturais na parte distal de sua cauda, alguns formam uma placa basal com uma a seis fibras, enquanto outros bacteriófagos contêm proteínas e ácidos não-nucleicos em seus capsídeos. Variam em forma e tamanho, podendo conter de seis a mais de 100 genes¹⁰.

Os bacteriófagos contendo DNA fita dupla (dsDNA) são provavelmente o grupo numericamente abundante de organismo similar na biosfera, e aproximadamente 4.500 bacteriófagos dsDNA são capazes de infectar uma grande diversidade de hospedeiros bacterianos. A classificação de bacteriófagos pelo seu grupo hospedeiro, morfologia ou avaliação de ciclos de vida tem conduzido para conclusões conflitantes a respeito de sua origem e evolução¹¹.

Os bacteriófagos não possuem metabolismo próprio, pois dependem da bactéria hospedeira na qual se multiplica. Exibem uma larga faixa de hospedeiros, tendo como alvo usualmente linhagens específicas⁴. O ciclo de reprodução fágica tem como primeiro passo o reconhecimento por um receptor primário da célula hospedeira, seguido pela adsorção em um segundo receptor. A primeira adesão é reversível – a célula pode não estar viva. A segunda adesão é irreversível, e subsequentemente, o DNA fágico circulariza e a bactéria inicia a produção de proteínas fágicas. Essas proteínas sequestram a célula hospedeira por inteiro e forçam a mesma a produzir exclusivamente novos bacteriófagos. Após a reunião da progênie fágica, duas proteínas fágicas promovem a quebra do envelope celular (lise), resultando na liberação de novos bacteriófagos, prontos para iniciar o novo ciclo. A especificidade extremamente alta dos bacteriófagos para um hospedeiro distinto é atribuída a cada passo no processo, que requer o sistema bacteriófago/hospedeiro para ser compatível. A capacidade de reconhecer os diferentes receptores da parede celular é útil se a informação genética do bacteriófago não puder ser "lida" pelo hospedeiro. Também, cada bactéria certamente tem seu próprio complemento de bacteriófagos especializados com os quais se completa, e bacteriófagos não especializados que serão inefetivos. Na ausência da bactéria alvo, os bacteriófagos se desintegram em partículas comuns biológicas que são naturalmente absorvidas de volta ao ambiente⁵.

A temperatura e o tipo de hospedeiro podem influenciar o número de progênie fágica gerada e em

geral todo o ciclo, mas para aplicação em alimentos, é importante lembrar que o sucesso da infecção inevitavelmente leva a célula à morte. A partir do momento em que a aplicação dos bacteriófagos em alimentos é concebida, com o objetivo de remover uma bactéria contaminante, a célula terá que encontrar um bacteriófago. Esse encontro resulta na infecção e conseqüentemente na lise bacteriana. Em termos ecológicos, a população fágica apenas aumentará quando existir número suficiente de células hospedeiras, mas esse não é o objetivo da aplicação de bacteriófagos em alimentos. O objetivo é a erradicação do patógeno como um modo apropriado de prevenir um futuro aumento indesejável do mesmo. Esse somente estará em baixos números se as condições de higiene forem adotadas no processamento de alimentos, o que significa que um número suficiente de bacteriófago tem que ser aplicado para a interação bacteriófago/hospedeiro tornar-se viável⁵.

Considerações em uma estratégia de biocontrole com bacteriófago

O uso de bacteriófagos como agente antimicrobiano e como ferramenta para detecção de patógenos em alimentos e produtos alimentícios vem aumentando em várias partes do mundo. Os campos de aplicação compreendem desde a segurança da água e alimentos ao emprego na agricultura e saúde animal. Um exemplo é a recente aprovação pela “US Environmental Protection Agency” do produto comercial “Agriphage” para o controle de bactéria patogênica em ambientes. Na indústria de produção de alimentos, a “Food and Drug Administration” (FDA) aprovou em 2006 a utilização de um “pool de bacteriófagos” denominado bacteriófago P100 (Listex™P100) para o controle de *Listeria monocytogenes* em carnes e queijos¹.

O biocontrole com bacteriófagos tem as vantagens exclusivas de se tratar de um reagente natural, que se automultiplica e é altamente específico²⁰. Outra qualidade valiosa é a notável estabilidade dos bacteriófagos em alimentos²¹. Bacteriófagos de *Campylobacter* podem sobreviver aos procedimentos de abate de aves¹², uma característica necessária para assegurar a sua capacidade de controlar as bactérias durante a vida útil dos alimentos.

Em um estudo toxicológico em ratos, uma preparação purificada do bacteriófago P100 foi utilizada

para investigar a sua segurança e tolerância, e nenhuma mudança histopatológica, mortalidade ou morbidade relacionada ao P100 foi observada pelos autores²². Outros estudos anteriores da aplicação do bacteriófago em animais também não reportaram qualquer efeito adverso ou inesperado do vírus de bactérias^{23,24}. Paralelo a esses resultados, um estudo com voluntários humanos recebendo o bacteriófago T4 indicou que o mesmo é seguro para a administração oral; e nenhum bacteriófago ou anticorpos específicos do bacteriófago puderam ser detectados²⁵.

Apesar destas vantagens excepcionais, alguns autores têm desenvolvido argumentos questionando a eficácia de bacteriófagos como agentes antimicrobianos^{26,27}. A transdução dos bacteriófagos pode transferir características indesejáveis, tais como genes virulentos, de um organismo para outro, e a conversão lisogênica pode produzir células bacterianas que não são mais suscetíveis a ataques. Bacteriófagos por si só podem sofrer mutações de bacteriófagos líticos virulentos para bacteriófagos temperados, que geralmente formam uma associação não lítica com as bactérias hospedeiras, resultando em lise de apenas uma pequena proporção da população²⁸. Portanto, para serem usados em qualquer aplicação de biocontrole, os bacteriófagos devem ser cuidadosamente caracterizados para determinar se eles podem executar transdução generalizada, ou se eles carregam qualquer gene de virulência que poderia ser expresso no hospedeiro antes da morte².

Carlton et al²², ao sequenciarem o genoma do bacteriófago P100, não encontraram nenhuma similaridade em qualquer um dos 174 produtos dos genes preditos do P100 para qualquer toxina conhecida ou suspeita, ou outro fator envolvido na regulação da virulência e/ou patogenicidade de *Listeria* ou outros organismos.

A utilização de misturas de bacteriófagos de distintas famílias pode vir a ajudar a resolver os problemas relacionados com a resistência bacteriana^{16,27,29}. Em uma investigação de controle da contaminação por *E. coli* O157:H7 através de bacteriófagos, O’Flynn et al³⁰ concluíram que os bacteriófagos KH1, KH4 e KH5 são específicos para o sorotipo O157, considerando o fato de que esses bacteriófagos lisaram todas as linhagens de *E. coli* O157 testadas e não lisaram as linhagens que não eram de *E. coli* ou de *E. coli* O157, ou linhagens de *E. coli* O157 mutante deficiente. Segundo os autores, a infecção fágica foi dependente da natureza do lipopolissacarídeo (LPS) O157 presente e que o complemento de *E. coli*

O157-mutante deficiente, *E. coli* F12 (pF12), que produz um O157 LPS truncado, foi resistente à infecção. Consistente com essa ideia, os autores afirmam que resultados preliminares indicam que nas linhagens *E. coli* O157:H7 resistentes aos bacteriófagos existem significativas alterações no comprimento ou na regulação da produção do LPS. Tanji et al²⁹ conduziram um estudo do mecanismo de resistência do bacteriófago em *E. coli* O157:H7 e verificaram que o uso de coquetéis de fagos utilizando receptores celulares distintos reprimia o aparecimento da resistência.

Uma das mais importantes vantagens do biocontrole de bactérias patogênicas por bacteriófagos é a especificidade por um hospedeiro particular. A afinidade bem sucedida de um bacteriófago para com o seu hospedeiro exige vínculo entre receptores específicos na superfície celular e antirreceptores no fago². Os receptores típicos incluem a membrana externa que transporta proteínas, lipopolissacarídeos, carboidratos, e estruturas especializadas como os flagelos. Alguns fagos podem se ligar a vários receptores ou a mais de um receptor simultaneamente³¹. Consequentemente, um patógeno como *E. coli* O157:H7 pode ser infectada por um bacteriófago em particular, mas sorovares não patogênicos estreitamente relacionadas podem permanecer inalterados.

A especificidade dos bacteriófagos com o hospedeiro sugere que a infecção de células humanas é improvável². O uso medicinal extensivo de terapia com bacteriófagos na antiga União Soviética e nos países da Europa Oriental sugere que as preparações de bacteriófagos podem ser ingeridas com segurança³². Trabalhadores e seus familiares ingeriram preparações de bacteriófagos antes da avaliação clínica com o intuito de comprovar sua segurança³³. As experiências com animais demonstraram que a dose oral para o hospedeiro não adaptado ao bacteriófago, mesmo quando elevada, não desencadeou a presença de bacteriófagos no sistema circulatório²⁴. Mesmo quando bacteriófagos são utilizados em doses terapêuticas, há pouca evidência em seres humanos sobre graves reações imunes aos bacteriófagos. Algumas leves reações adversas foram relatadas em menos que 0,5% dos pacientes com terapia, mas os efeitos foram facilmente revertidos²⁴. Entretanto, um grande problema que pode advir do uso de bacteriófagos é a liberação de toxinas bacterianas oriundas da lise dessas células, mas isto também é observado com outras práticas usadas para o controle do crescimento bacteriano.

Outro fator em alguns sistemas alimentares é a presença de um número significativo de células bacterianas não hospedeiras. Nesse caso, a eficiência dos bacteriófagos como agentes de biocontrole é limitada por uma dependência em relação à difusão passiva do transporte de partículas infecciosas para o hospedeiro².

Sobrevivência do bacteriófago em alimentos e nas instalações do processamento

Considerações sobre a estabilidade de bacteriófagos em alimentos são importantes porque, para se ter sucesso com o uso de bacteriófagos como agentes de biocontrole, eles precisam ser estáveis sob as condições físico-químicas (por exemplo, o pH e a atividade de água) dos alimentos a que serão aplicados².

Matriz do alimento: A concentração do bacteriófago deve ser alta o bastante para permitir o contato das partículas virais com a célula hospedeira no alimento, em um dado tempo e de acordo com a limitação espacial. Em alimentos líquidos isto não se traduz em problema, devido ao fato de que as partículas fágicas podem se difundir mais livremente. Entretanto, a situação é diferente em alimentos sólidos onde a habilidade da superfície para absorver líquido da suspensão fágica se constitui em parâmetro decisivo³⁴.

Tolerância ao pH: A investigação do efeito lítico de bacteriófagos específicos para *Salmonella* na redução da população do micro-organismo em fatias de melão fresco e maçã, contaminados experimentalmente, indicou que o baixo pH das fatias de maçã (pH 4,2 versus pH 5,8 para as fatias de melão) pode ter contribuído para a ineficácia do tratamento com o bacteriófago. Outro estudo conduzido posteriormente pelos autores, também com fatias de melão e maçã frescos, inoculados experimentalmente com *L. monocytogenes*, demonstrou resultados semelhantes, ou seja, o título do “pool” de bacteriófagos declinou consideravelmente nas fatias de maçã, resultando na ineficácia do tratamento¹⁶. Uma vez que o pH do alimento não se encontra na faixa crítica, a inativação das partículas fágicas pode ser devida secundariamente a compostos presentes naturalmente em alimentos, conhecidos por inativar vírus e bacteriófagos, tais como os ácidos orgânicos e taninos³⁴.

Termotolerância: O efeito do estresse térmico sobre os bacteriófagos pode ser variável. A sobrevivência

de bacteriófagos termotolerantes ao processo de pasteurização é um importante ponto de entrada para os bacteriófagos em laticínios. O exame de bacteriófagos de *Lactobacillus helveticus* por Quiberoni et al³⁵ revelou que a termotolerância foi dependente do bacteriófago e do meio utilizado, com alguns isolados inativados em temperaturas de pasteurização de 63 a 72°C e outros exigindo tratamento a 90°C. Bacteriófagos isolados a partir de soro de queijo e iogurte requereram aquecimento a 90°C durante 5 minutos para reduzir os números de 10^6 - 10^7 UFP/mL para menos de 10 UFP/mL³⁶. Estudo mais recente conduzido por Avsaroglu et al³⁷ demonstra que o tratamento com o uso de pressão de 350 MPa/5min. e calor a 71,7°C/3min. foi efetivo na inativação de bacteriófagos específicos para bactérias lácticas. Assim, os bacteriófagos podem ser mais resistentes ao calor do que a maioria das bactérias vegetativas, podendo sobreviver a tratamentos térmicos aplicados rotineiramente para alguns alimentos.

Luz visível e ultravioleta: A maioria dos efeitos inativadores parece ser devido aos danos acumulados nos ácidos nucleicos. Em sistemas aquáticos, a luz solar (em especial UV-B) parece ser o principal fator no declínio do número de bacteriófagos³⁸.

Sanitizantes: Estudos em laticínios demonstraram que o hipoclorito de sódio (100 ppm de cloro livre) e o ácido peracético inativaram bacteriófagos do leite dentro de 5 a 10 min³⁵. O uso de etanol a 75% (v/v) foi efetivo contra bacteriófagos, enquanto o isopropanol não foi tão eficaz. Como os bacteriófagos são em geral mais capazes de resistir às mudanças ambientais do processamento de alimentos que as bactérias, eles podem persistir em locais que não sejam limpos e sanitizados adequadamente²¹.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas para controle de bactérias patogênicas não devem alterar as propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos. Elas devem ser seguras, de baixo custo e aceitas pela população. Atualmente, nenhuma técnica atende a todos esses critérios, embora uma ampla gama de metodologias tem sido proposta para o controle de patógenos e micro-organismos deterioradores em alimentos. Estratégias de intervenção focalizando o início da cadeia produtiva têm sido usadas, entretanto essas medidas são caras e difíceis de serem mantidas.

A aplicação de bacteriófagos virulentos para o controle de micro-organismos patogênicos em alimentos representa uma alternativa para as abordagens tradicionais à preservação e segurança alimentar. Infelizmente, a maioria dos dados disponíveis na literatura é relacionada a estudos utilizando alimentos inoculados artificialmente. A tecnologia deve ser transferida para o campo para avaliar o potencial do biocontrole com bacteriófago em bactérias contaminantes naturais em condições práticas de produção de alimentos, processamento e armazenamento. De todos os fatores com potencial para limitar a eficácia do controle de bactérias através dos bacteriófagos, a preocupação mais significativa é a gama restrita de hospedeiros em relação à diversidade de bactérias susceptíveis que habitam os alimentos. Uma abordagem mais gratificante e prática seria gerar bacteriófagos com uma gama mais extensa de hospedeiros e, em seguida, montar um “pool” de bacteriófagos com atividades complementares. Além do mais, os bacteriófagos também poderiam ser usados como um componente adicional, onde eles poderiam agir sinergicamente quando aplicados com um agente antimicrobiano compatível, como por exemplo, uma bacteriocina.

O árbitro final do sucesso da aplicação de bacteriófagos em alimentos será, contudo, o consumidor. Por esta razão, é prudente considerar cuidadosamente a fonte de qualquer bacteriófago a ser aplicado aos alimentos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. García P, Martínez B, Obeso JM, Rodríguez A. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett App Microbiol*. 2008; 47:479-85.
2. Hudson JA, Billington C, Carey-Smith G, Greening G. Bacteriophages as biocontrol agents in food. *J Food Prot*. 2005; 68(2):426-37.
3. Sulakvelidze A, Barrow P. Phage therapy in animals and agribusiness. In: Kutter, E, Sulakvelidze A. *Bacteriophages: biology and applications*. Boca Raton: CRC Press; 2005. p.335-80.
4. Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P et al. Metagenomic analysis of an uncultured viral community from human feces. *J Bacteriol*. 2003; 185(20):6220-23.

5. Hagens S, Offerhaus ML. Bacteriophages – New weapons for food safety. *Food Technol*. 2008; 62(4): 46-54.
6. Greer GG. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J Food Prot*. 2005; 68(5):1102-11.
7. Goode D, Allen VM, Barrow PA. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(8):5032-6.
8. Leverentz B, Conway WS, Alavidze Z, Janisiewicz WJ, Fuchs Y, Camp MJ et al. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *J Food Prot*. 2001; 64(8):1116-21.
9. Whichard JM, Sriranganathan N, Pierson FW. Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. *J Food Prot*. 2003; 66(2):220-5.
10. Pelczar JR, Chan ECS, Krieg NR. *Microbiologia – conceitos e aplicação*. 2ª ed. São Paulo: Makron; 1997. 525p.
11. Moselio S, Engleberg CN, Barry I. *Microbiologia*. 3a ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2002. 664p.
12. Atterbury RJ, Connerton PL, Dodd CE, Rees CE, Connerton IF. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(10):6302-6.
13. Loc Carrillo C, Atterbury RJ, El-Shibiny A, Connerton PL, Dillon E, Scott A et al. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71(11): 6554–63.
14. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM. Alternatives to antibiotics: utilization of bacteriophage to treat colibacillosis and prevent foodborne pathogens. *Poul Sci*. 2005; 84(4):655-9.
15. Toro H, Price SB, McKee S, Hoerr FJ, Krehling J, Perdue M et al. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chicken. *Avian Dis*. 2005; 49(1):118-24.
16. Leverentz B, Conway WS, Camp MJ, Janisiewicz W, Abuladze T, Yang M et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(8):4519-26.
17. Leverentz B, Conway WS, Janisiewicz W, Camp MJ. Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. *J Food Prot*. 2004; 67(8):1682-6.
18. Hendrix RW, Margareth CM, Smith R, Burns N, Ford ME, Hatful AG. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1999; 19, 2192-97.
19. Joklik WK, Willente HP, Amos DB, Wilfert, CM. *Zinsser microbiología*. 20a ed. Bogotá: Panamericana; 1994.
20. Modi R, Hirvi Y, Hill A, Griffiths MW. Effect of phage on survival of *Salmonella Enteritidis* during manufacture and storage of Cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J Food Prot*. 2001; 64(7):927-33.
21. Kennedy JEJ, Bitton G. Bacteriophages in foods. In: Goyal SM, Gerba CP, Bitton G, editors. *Phage ecology*. New York: John Wiley & Sons; 1987. p.286-316.
22. Carlton RM, Noordman WH, Biswas B, Meester ED, Loessner MJ. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Reg Toxic Pharmacol*. 2005; 43(3):301-12.
23. Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann ML, Brüssow H. Phage-host interaction: an ecological perspective. *J Bacteriol*. 2004; 186:3677-86.
24. Merrill CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S et al. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1996; 93:3188-92.
25. Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(7):2874-78.
26. Joerger RD. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult Sci*. 2003; 82(4):640-7.
27. Sklar IB, Joerger RD. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in chickens. *J Food Saf*. 2001; 21(1):15-29.
28. Ackermann HW, Greer GG, Rocourt J. Morphology of *Brochothrix thermosphacta* phages. *Microbios*. 1988; 56(226):19-26.
29. Tanji Y, Shimada T, Yoichi M, Miyanaga K, Hori K, Unno H. Toward rational control of *Escherichia coli* 0157:H7 by a phage cocktail. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; 64(2):270-4.
30. O'Flynn G, Ross RP, Fitzgerald GF, Coffey A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* 0157:H7. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70:3417-21.
31. Goldberg EL, Griuius L, Letellier L. Recognition, attachment, and injection. In: Karam JD. *Molecular biology of bacteriophage T4*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1994. p.347-56.
32. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JGJ. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(3):649-59.
33. Summers WC. Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol*. 2001; 55:437-51.
34. Guenter S, Huwyler D, Richard S, Loessner MJ. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75(1):93-100.
35. Quiberoni A, Suarez VB, Reinheimer JA. Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments. *J Food Prot*. 1999; 62(8):894-98.
36. Binetti AG, Reinheimer JA. Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. *J Food Prot*. 2000; 63(4):509-15.
37. Avsaroglu MD, Bozoglu F, Mustafa Akçelik M, Bayindirli A. Effect of high pressure on lactococcal bacteriophages. *J Food Saf*. 2009; 29:26-36.
38. Sinton LW, Hall CH, Lynch PA, Davies-Colley RJ. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from water stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(3):1122-31.