



Bacteriófagos más allá de la fagoterapia: aplicaciones para el control bacteriano en la clínica, la industria y el ambiente

Bacteriophages beyond phage therapy: applications for bacterial control in clinic, industry, and the environment

Marlon Alexis Gallego Gómez , Judy Natalia Jiménez Quiceno

Resumen

Introducción: Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias, representan la entidad más abundante del planeta, son bastante ubicuos ya que se encuentran en la mayoría de ecosistemas. Sobre la base de sus características únicas y propiedades antibacterianas, son cada vez más atractivos en aplicaciones más allá de la fagoterapia.

Objetivo: Describir las aplicaciones que se han enfocado en ampliar el uso de los fagos para control, principalmente de biopelículas, ya sea en superficies bióticas (alimentos) o abióticas (superficies, agua y redes de distribución, entre otras.), así como también en sectores tan diversos que incluyen la industria, la clínica y el ambiente con resultados prometedores.

Metodología: Búsqueda bibliográfica en las bases de datos PMC Medline y ScienceDirect de literatura publicada entre los años 2005-2021.

Resultados: Los resultados de los estudios muestran un panorama bastante prometedor sobre la utilidad de los fagos como estrategia de control en los diferentes contextos analizados.

Conclusión: Los bacteriófagos conforman una herramienta eficaz que permitirá en un futuro próximo mejorar procesos industriales, la salud humana y ambiental.

Palabras clave: Bacteriófagos, biocontrol, biopelículas, coctel de fagos, superficies, resistencia antimicrobiana.

Integrantes Grupo de Investigación en Microbiología Básica y Aplicada – MICROBA, Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Correo de correspondencia:
jnatalia.jimenez@udea.edu.co

Recepción: 5/07/2022. Aceptación: 18/07/2022

Cómo citar este artículo: Gallego Gómez, M., Jiménez Quiceno, J.N. Bacteriófagos más allá de la fagoterapia: aplicaciones para el control bacteriano en clínica, industria y ambiente. Hechos Microbiol. 2022;13(1)20-36. DOI: 10.17533/udea.hm.v13n1a03

Abstract

Introduction: Bacteriophages are viruses that infect bacteria, they represent the most abundant entity on the planet, they can be found in almost all ecosystems. Based on their unique characteristics and antibacterial properties, they are becoming increasingly attractive in other applications rather than phage therapy.

Objective: to describe applications that have focused on expanding the use of phages for the control, mainly of biofilm, either on both biotic (food) or abiotic surfaces (water, and distribution networks, among others), Also in diverse sectors like industry, the clinic and the environment with promising results.

Methodology: Bibliographic search published between the years 2005-2021 in the PMC Medline and ScienceDirect databases.

Results: The results of the studies show a very promising prospect on the usefulness of phages as a control strategy in the different contexts analyzed.

Conclusion: Bacteriophages are an effective tool that will allow in the near future to improve industrial processes, human and environmental health.

Keywords: Bacteriophages, biocontrol, biofilms, phage cocktail, surfaces, antimicrobial resistance.

causadas por bacterias, en lo denominado fagoterapia; no obstante, este re-descubrimiento ha dejado claro que sus características biológicas únicas y propiedades intrínsecas los hacen importantes en otros escenarios, en ese sentido se han empezado a explorar los fagos como agentes controladores de biopelículas y en otros sectores como el ambiente, la industria y la clínica.

Metodología de la búsqueda de la información

La información utilizada en esta revisión se obtuvo de dos bases de datos bibliográficas: PMC Medline y ScienceDirect. Se seleccionaron artículos en español e inglés publicados entre los años 2005-2021. Los descriptores utilizados en la búsqueda se relacionaron con: “Bacteriophage” or “Phage” and: (i) “Bacteriophage applications” (ii) “Phage biocontrol” (iii) “Biofilm”.

Los artículos seleccionados incluyeron artículos originales, revisiones y revisiones sistemáticas. La selección de artículos se centró en aquellos cuyas aplicaciones fueran diferentes a fagoterapia dándole importancia a aquellos artículos relacionados con el control bacteriano en la clínica, la industria y el ambiente.

Introducción

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias, su biomasa excede por mucho a la mayoría de organismos vivos y son particularmente ubicuos, se encuentran en la mayoría de hábitats donde se hallan sus hospederos. Fueron descubiertos a principios del siglo XX de forma independiente por Frederick Twort y Felix d’Herelle, este último enfocándolo en el tratamiento de enfermedades infecciosas con mucho éxito; sin embargo, su uso disminuyó con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming. No obstante, el uso desmedido de los antibióticos ha llevado a lo que muchos han denominado una era post-antibiótica con altas tasas de resistencia, por lo que el uso de los bacteriófagos y su “re-descubrimiento” ha tomado gran fuerza. Durante los últimos años los esfuerzos se han centrado en el uso clínico de los bacteriófagos como una herramienta para el tratamiento de infecciones

Historia de los bacteriófagos y primeras aplicaciones

En 1896, el bacteriólogo británico Ernest Hankin, informó por primera vez sobre la posible actividad antibacteriana que existía en las aguas del río Ganges y el río Yamuna en India, frente a microorganismos causantes del cólera. Sin embargo, en ese momento el agente antibacteriano no pudo ser identificado y las implicaciones de sus hallazgos no tuvieron mayor repercusión científica, y el suceso fue designado como el “fenómeno Hankin”^[1].

Fue solo hasta 1915 y 1917 que los científicos Frederick Williams Twort (1877-1950) y Felix d’Herelle observaron de manera independiente la existencia de virus que lisaban bacterias. Twort encontró en un cultivo bacteriano la presencia de pequeñas placas de lisis al que denominó “Factor lítico bacteriano” y señaló que dicho factor responsable de la lisis podría

ser un virus. Posteriormente, en 1917, el francés Felix d'Herelle reportó el hallazgo de un "microbio invisible antagónico del bacilo de la disentería" a los cuales denominó bacteriófagos. Así, el mérito del descubrimiento de los bacteriófagos recayó de forma tácita en estos dos investigadores^[2].

Las primeras aplicaciones alrededor de los bacteriófagos ocurrieron posterior a 1917, al ser el pionero, d'Herelle comenzó a probar sus filtrados en pacientes humanos en compañía del doctor Victor-Henri Hutinel en el Hospital des Enfants-Malades de París, allí demostró la seguridad de sus fagos, al ingerirlos él mismo, y la eficacia, al tratar a un niño de 12 años con cuadro de disentería severa, quien resolvió los síntomas después de un solo tratamiento y se recuperó por completo. Posteriormente, se administró a otros tres pacientes, los cuales comenzaron a recuperarse dentro de las 24 horas posteriores^[3]. En 1923, dos médicos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Baylor informaron resultados exitosos de uno de sus ensayos de terapia con fagos realizados en los Estados Unidos y concluyeron que los bacteriófagos tenían muy buena capacidad antimicrobiana^[4]. En la década subsiguiente d'Herelle siguió trabajando en seguir aislando fagos y los continuó suministrando a pacientes con muy buenas tasas de curación, se implementó entonces el término fagoterapia para referirse al tratamiento, con fagos, de pacientes con infecciones bacterianas.

Sin embargo, el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming y la capacidad de producción a gran escala terminó por excluir los bacteriófagos a una esfera muy pequeña, llevando su uso casi a su exterminio. No obstante, luego de la segunda guerra mundial y a la subsiguiente guerra fría, los soviéticos retomaron los estudios de d'Herelle y siguieron implementando esta técnica para su beneficio.^[5] La posterior caída del muro de Berlín y la reciente necesidad de contar con alternativas para el tratamiento de bacterias resistentes a los antibióticos hizo que se retomara el estudio de los bacteriófagos con fines curativos por parte de occidente. El panorama actual es increíblemente prometedor y cada vez cobra más relevancia las futuras aplicaciones en temas de fagos, ya no solo en el ámbito clínico, sino también en el campo industrial, de alimentos y de desinfección^[6].

Características de los bacteriófagos y proceso de infección en la célula bacteriana

La clasificación taxonómica de los fagos se basa principalmente en su forma, tamaño y tipo de material genético. Los más abundantes pertenecen al orden *Caudovirales*, que se caracterizan por presentar ADN de doble cadena, se dividen en tres familias: *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*, basados en las características de la morfología de la cola^[7].

En términos generales la forma en la cual los bacteriófagos pueden infectar a sus hospederos se puede clasificar según dos ciclos de vida diferentes, lítico y lisogénico^[8]. En la mayoría de los fagos, el ciclo lítico termina con la lisis de la bacteria huésped y la liberación de su progenie (Fig. 1). Por ende, las propiedades antimicrobianas de los bacteriófagos están ligadas precisamente al ciclo lítico (fagos líticos) ya que se pretende que el huésped infectado muera. Por el contrario, en el ciclo lisogénico los bacteriófagos (fagos temperados) tienen la habilidad de establecer su genoma en el cromosoma bacteriano (profago) sin destruir su hospedero; sin embargo, pueden cambiar al ciclo lítico una vez encuentran señales ambientales desencadenantes, de forma tal que eliminan sólo a una pequeña porción de la población infectada.

La adsorción del bacteriófago y la liberación de la nueva progenie juegan un papel clave en el proceso de infección ya que en este paso algunos fagos poseen polisacáridos depolimerasa que son enzimas hidrolíticas específicas que pueden escindir polisacáridos o sus derivados como sustrato; diversos modelos bacterianos poseen cápsides de polisacáridos o pueden formar agregados usando azúcares [9]. Se ha demostrado que la actividad de las enzimas hidrolíticas está relacionada con las proteínas de la punta de la cola del fago^[10]. La presencia de polisacáridos depolimerasa confiere al fago una ventaja evolutiva ya que potencia el proceso de adsorción y dispersión para iniciar el proceso de infección en nuevas bacterias. Adicionalmente, algunos fagos están provistos de enzimas líticas que se denominan VAPGH (hidrolasas de peptidoglicano asociadas a bacteriófagos), que desempeñan un papel importante en el primer paso del ciclo de infección. Su actividad produce un orificio en la pared celular a través del cual el material genético del fago ingresa al citoplasma, y genera una lisis

–externa– inducida por la adsorción de un elevado número de fagos a la célula^[11]. Recientemente, estas proteínas también han sido propuestas como antimicrobianos potenciales debido a su actividad lítica^[12].

Por otra parte, la mayoría de fagos de cadena doble codifican otras proteínas líticas, denominadas endolisinas, que actúan junto con proteínas llamadas holinas para romper la pared celular y lisar la bacteria huésped en el último paso del ciclo de infección lítica, denominada también lisis –interna–. Las endolisinas, que también son hidrolasas de peptidoglicano, acceden al espacio periplásmico a través de orificios formados por las holinas en la membrana citoplasmática. La hidrólisis de peptidoglicano produce la desestabilización de la estructura de la pared celular y genera una lisis generalizada por el aumento de la presión osmótica en el interior del citoplasma. En las bacterias Gram positivas, las endolisinas son capaces de degradar el peptidoglicano cuando se añaden desde el exterior de la célula, lo que les confiere una actividad antimicrobiana^[13]. En las bacterias Gram negativas, el peptidoglicano está protegido por la membrana externa, por lo que estas bacterias pueden resultar resistentes a las endolisinas.

Sin embargo, recientemente se han descrito endolisinas modificadas denominadas Artilisinas, que logran penetrar la membrana externa, al combinar la endolisina con un péptido policatiónico, permitiendo su efectividad frente a estas bacterias^[14].

El uso de proteínas con actividad lítica antimicrobiana codificadas por fagos, presenta ventajas sobre el uso de la partícula viral completa; por ejemplo, a la fecha no se ha descrito ninguna bacteria resistente a las proteínas líticas producidas por los fagos^[12]. Además, el espectro de actividad de las endolisinas suele ser más amplio que el rango de huéspedes de los bacteriófagos, así mismo, no hay riesgo de transferir genes de virulencia, convirtiéndose en candidatas perfectas para posibles tratamientos en humanos^[15].

Teniendo en cuenta las propiedades que presentan bacteriófagos y las proteínas derivadas de estos frente a bacterias, se plantean como una excelente herramienta no solo para fagoterapia, ampliamente descrito en la literatura, sino además para procesos de desinfección y control bacteriano en el área clínica, ambiental, agrícola y en la industria de medicamentos y alimentos^[16].

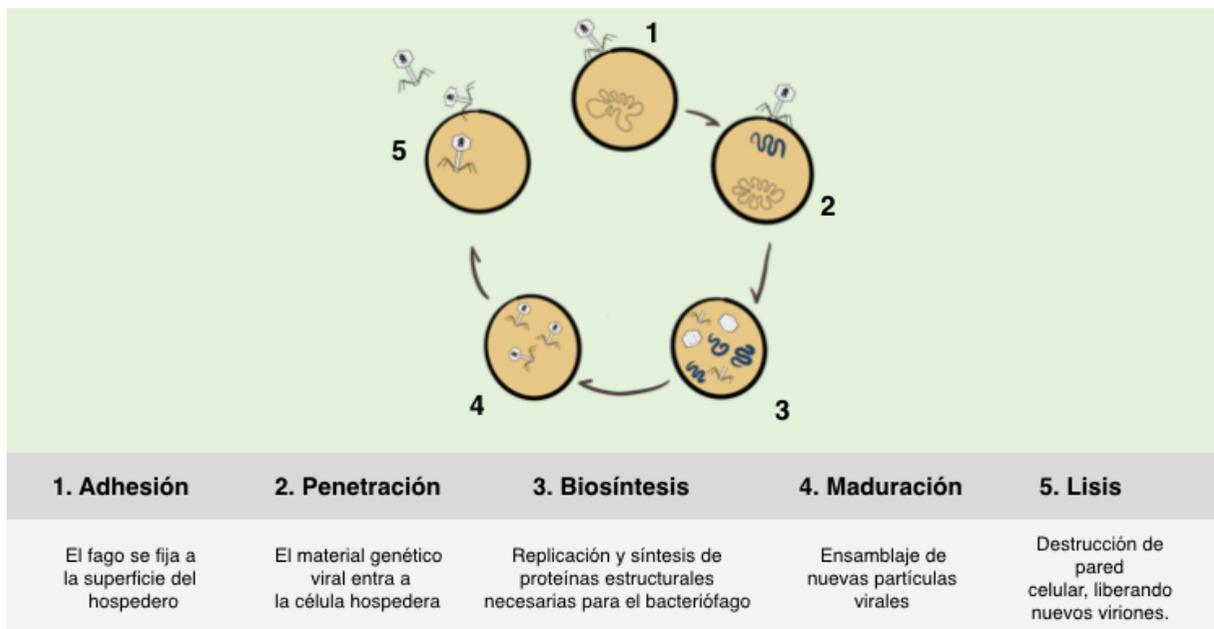


Figura 1. Ciclo Lítico

Aplicaciones de fagos: Prevención y control de biopelículas

COMPOSICIÓN Y FUNCIÓN DE LA BIOPELÍCULA BACTERIANA

Las biopelículas son agregados bacterianos que juegan un papel importante en la persistencia microbiana, fueron descritas por primera vez por Van Leeuwenhoek en las superficies de los dientes, donde el crecimiento de microorganismos formaban comunidades con capacidad de adherencia, desarrollando una placa visible^[17]. No obstante, sólo hasta 1978 la teoría de las biopelículas fue finalmente propuesta por Costerton y colaboradores^[18].

Las biopelículas están compuestas por bacterias individuales que se unen entre sí formando conglomerados, éstos secretan una matriz de polisacáridos, fibrina, lipoproteínas y otras sustancias que se incrustan en la matriz polimérica extracelular para formar el agregado o biopelícula^[19]. Dichos polímeros extracelulares son fundamentales para la estructura y la estabilidad de las mismas^[20], tanto así que en la mayoría de las biopelículas bacterianas, la proporción de microorganismos en materia seca es tan solo el 10% en comparación con la matriz extracelular, que puede representar hasta el 90 %, conformando la estructura tridimensional que soporta la adhesión superficial y la cohesión que mantiene su integridad^[21]. Esta estructura funciona como una barrera de difusión y puede unirse directamente a los agentes antibacterianos para evitar que penetren impidiendo su acción, por lo que dicha característica hace que su tratamiento sea más difícil.

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

La formación de biopelículas es un proceso variado que se puede dividir en dos etapas. En una etapa temprana las células bacterianas se adhieren a una superficie y luego crecen generando una comunidad fija. Posteriormente, se dispersan de la comunidad formada a un nuevo entorno y comienzan un nuevo ciclo^[22].

En la primera etapa de la formación, la adhesión a la superficie se puede dar de dos formas, en unión reversible e irreversible. La adhesión reversible está mediada por fuerzas de Van der Waals no específicas, de tipo electrostático. Por el contrario, la adhesión irreversible se basa en la adhesión mecánica de las bacterias usando el *pili* o sus flagelos a la superficie de unión^[23, 24]. Cuando las células bacterianas libres se adhieren a la superficie de forma irreversible, se reproducen y van acompañadas de una síntesis de matriz polimérica extracelular. La matriz de polímero extracelular conduce a que se potencie la adsorción mutua y genere mayor unión a la superficie del objeto. El crecimiento continuo de células bacterianas en la superficie adherida va madurando gradualmente, formando una estructura compacta que consta de millones de células estrechamente espaciadas. La etapa final de la formación, es donde las células se separan de la población y se difunden en el medio ambiente para formar la siguiente biopelícula. Esta es una etapa esencial y evolutiva que contribuye a la propagación biológica, la supervivencia bacteriana y la resistencia a agentes externos^[25] (Fig. 2).

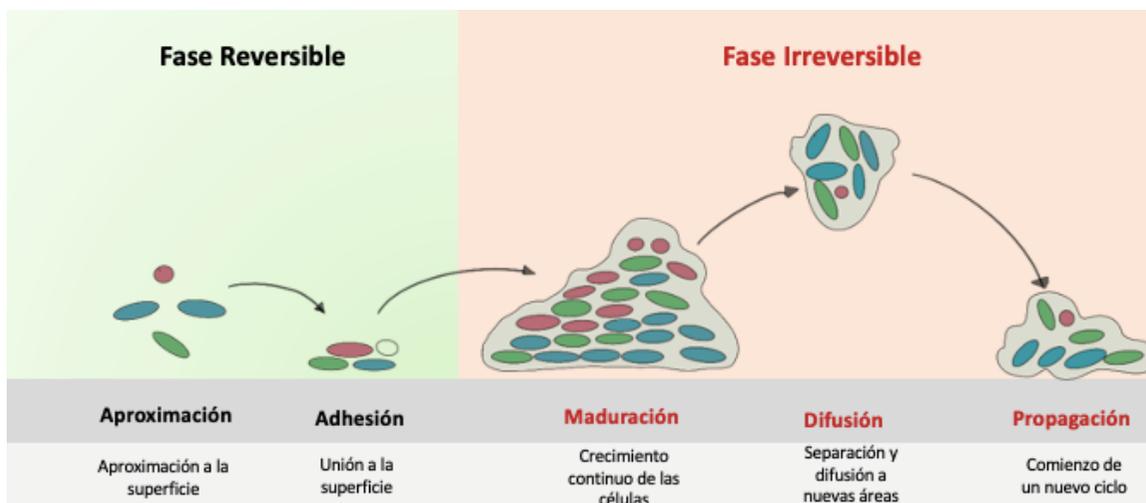


Figura 2. Ciclo de formación de biopelículas

Las biopelículas pueden desarrollarse a partir de la misma bacteria, pero también pueden formarse por diferentes bacterias^[26]. La difusión de la biopelícula también se puede dividir en tres etapas. Primero, las células bacterianas se separan de las colonias formadas. En segundo lugar, las bacterias se trasladan a una nueva ubicación. Por último, las células bacterianas se trasladan a un lugar adecuado para terminar de adherirse. Este mecanismo incluye también una difusión activa y pasiva. El primero lo llevan a cabo activamente las bacterias, y el segundo es la transferencia de partículas ya establecidas de biopelícula por acción de fuerzas externas. La difusión se puede clasificar según el patrón que sigan las bacterias que incluye: erosión, desprendimiento y siembra. La liberación continua de células individuales o pequeños grupos de células de la biopelículas, en niveles bajos, se denomina erosión. La pérdida rápida y masiva de biopelícula se conoce como desprendimiento y la liberación rápida de una cantidad de células individuales o pequeños grupos de células de una cavidad hueca formada dentro de una colonia de biopelícula se denomina siembra^[27, 28].

BIOPÉLICULAS BACTERIANAS EN SALUD Y LA INDUSTRIA

La mayoría de las bacterias pueden formar biopelículas, una vez establecidas, se afecta la respuesta inmune por parte del huésped, y la bacteria incrementa su virulencia y la resistencia antimicrobiana, lo que favorece su supervivencia y viabilidad. Las biopelículas son estructuras difíciles de eliminar, permiten que las bacterias permanezcan por mucho tiempo en el sitio anatómico o del dispositivo médico que invaden conduciendo a infecciones crónicas de difícil curación^[29, 30]; así mismo, las bacterias pueden liberarse de la biopelícula y causar nuevos focos de infección. El instituto nacional de salud de los estados unidos (NIH, del inglés National Institutes of Health) estima que las biopelículas están involucradas en el 65% de las infecciones bacterianas y en más del 80% de las infecciones crónicas^[31]. En el campo médico, también se han aso-

ciado a superficies e instrumentos hospitalarios. En la industria de alimentos y medicamentos, la inocuidad, se ve afectada por la presencia de biopelículas en el sistema de procesamiento del producto, las cuales son resistentes a los procesos de limpieza y desinfección, implicando un riesgo para la Salud Pública^[32, 33].

Así mismo, en sistemas de tratamientos de aguas potables y residuales, las biopelículas son difíciles de manejar, principalmente en los sistemas de filtración y de circulación^[34, 35].

ELIMINACIÓN DE LAS BIOPÉLICULAS POR FAGOS

Los bacteriófagos pueden eliminar las biopelículas de tres formas principales: (i) los fagos lisogénicos pueden integrarse en el genoma bacteriano y afectar la formación de la biopelículas^[36]; por ejemplo, se ha descrito como la integración del fago Bxb1 inactiva el gen *groEL1* de *Mycobacterium smegmatis*, este proceso ocasiona que las bacterias floten de forma libre y se evita la formación de la biopelícula madura^[37]; (ii) El fago limpia la biopelícula y lisa las células planctónicas codificando enzimas que catalizan la ruptura de enlaces denominadas liasas^[38], se han modificado bacteriófagos capaces de expresar la enzima DspB para degradar la β -1,6-N-acetil-D-glucosamina durante la infección, que es una adhesión crucial necesaria para la biopelícula; la DspB codificada por fagos se libera en el medio ambiente con la lisis de la célula huésped, lo que provoca una mayor degradación de la biopelícula y, por lo tanto, controla la formación de la misma. Este fenómeno demuestra la viabilidad de utilizar fagos modificados genéticamente con capacidad enzimática reductora de biopelículas^[39]. (iii) El fago expresa enzimas que degradan los polímeros extracelulares, destruye la matriz de polisacáridos y las proteínas encapsulantes limpiando la barrera protectora bacteriana y luego ingresando a la biopelícula para destruir las bacterias. Se han descrito las estrategias en las cuales el uso de bacteriófagos disminuye o remueve la formación de biopelículas (Fig. 3).

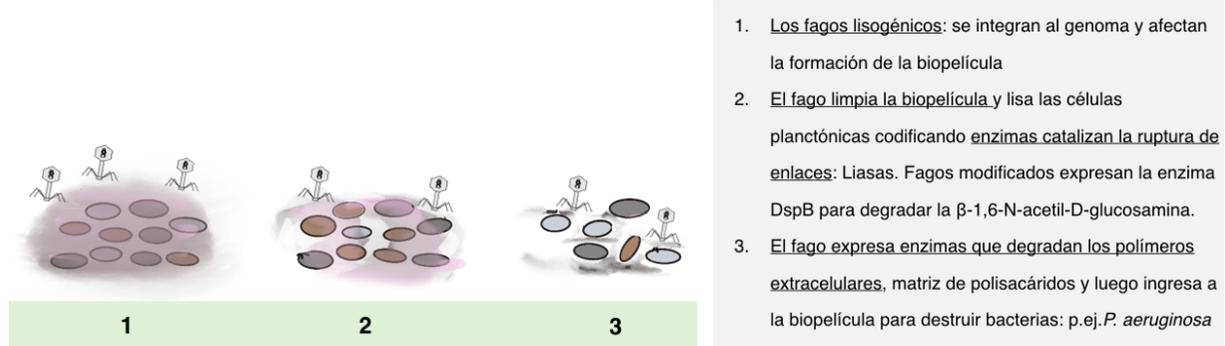


Figura 3. Modelo de figura de acción de fagos en biopelícula

Es así, como se han descrito fagos que pueden degradar los exopolisacáridos de *Pseudomonas aeruginosa*^[40]. Las depolimerasas producidas por la mayoría de los fagos solo reconocen los polisacáridos derivados del huésped y tiene ciertas limitaciones para expandir su espectro de acción^[41]. Sin embargo, se propone que de mano de la ingeniería genética, esta limitación se pueda superar en corto plazo para modificar las depolimerasas fágicas y ampliar su espectro de acción en futuros fagos.

La capacidad de eliminación de biopelículas por parte de los bacteriófagos ha hecho que se empleen en un número importante de escenarios en los que encontramos la industria de alimentos como principal protagonista en la incorporación de su uso, así como también en medio acuático y de forma reciente en el área clínica (Tabla 1).

FAGOS EMPLEADOS PARA EL CONTROL DE BIOPELÍCULAS EN EL ÁREA CLÍNICA

Recientemente se han utilizado con éxito fagos para reducir biopelículas en catéteres médicos y se empiezan a desarrollar productos comerciales para controlar bacterias productoras de biopelícula^[42]. Un ejemplo de esto, es el trabajo adelantado en *Proteus mirabilis*, que forma una densa biopelícula cristalina en catéteres, dando como resultado un bloqueo en el flujo de orina. En la etapa temprana de la infección bacteriana, se han encontrado fagos que pueden eliminar *P. mirabilis* reduciendo significativamente la formación de este tipo de recubrimientos^[43]. Así mismo, infecciones protésicas recurrentes debido a la presencia de biopelículas producida por *Klebsiella pneumoniae* se han

manejado con fagos con actividad lítica frente a esta bacteria, logrando resultados satisfactorios en comparación con los antibióticos^[44].

Las biopelículas formadas por *Enterococcus faecalis* y otras bacterias patógenas en la cavidad oral están comprometiendo la salud bucal^[45, 46]. Sin embargo, se han caracterizado fagos líticos que infectan y matan de manera eficiente cultivos planctónicos y sésiles de *E. faecalis*, tanto in vitro como in vivo, en modelos experimentales de infección del conducto radicular del diente^[47]. Este tipo de resultados de erradicación en la formación de la biopelícula implica una nueva forma en la mejora del tratamiento en infecciones orales en las cuales la formación de la biopelícula es tan común. En hospitales es muy frecuente la formación de biopelículas por parte de *P. aeruginosa* además que es una bacteria que exhibe una resistencia natural importante a los antibióticos, lo que ha atraído una atención generalizada para la búsqueda de bacteriófagos con actividad frente a esta bacteria^[48]. Se ha demostrado que fagos de la familia *Podoviridae* y *Myoviridae* pueden eliminar satisfactoriamente *P. aeruginosa* en modelos murinos y en las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística.

FAGOS EMPLEADOS PARA EL CONTROL DE BIOPELÍCULAS EN MEDIO ACUÁTICO

Los fagos pueden resolver la corrosión agravada de la infraestructura de distribución de agua y el bioincrustamiento debido a la generación de biopelículas. También pueden suprimir selectivamente la proliferación y la formación de espumas que pueden dificultar la clarificación de lodos, así como también reducir de forma preventiva la difusión de cepas resistentes a los

antibióticos en los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales^[49].

Las biopelículas de *P. aeruginosa* a menudo obstruyen los filtros en las plantas de tratamiento de agua potable y aumentan los costos de limpieza. Recientemente se han aislado fagos de aguas residuales para reducir la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* y se ha demostrado una sinergia cuando se agregan compuestos clorados para su eliminación^[50].

Por otro lado, también se ha encontrado que los fagos pueden reducir las tasas de adhesión microbiana en los módulos de membranas de ultrafiltración entre un 40 % y un 60 % y además, usados en sinergia en modo de cóctel pueden prevenir la formación de futuras biopelículas^[51]. El uso de fagos para controlar la contaminación del agua y los posibles daños en ductos de distribución causados por la formación de biopelículas, es una nueva tecnología rentable y respetuosa con el medio ambiente.

FAGOS EMPLEADOS PARA EL CONTROL DE BIOPÉLICULAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

En el sector alimentario, de forma reciente e importante, se han empezado a explorar las actividades

bactericidas de los fagos y sus enzimas en el tratamiento y descontaminación de bacterias patógenas, en ese sentido se han reportado un número importante de fagos, ya sea de forma individual o en forma de cóctel contra *Lysteria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7 y *S. entérica*, entre otros, con resultados prometedores^[52]. En general, estos resultados muestran un potencial notable de fagos y proteínas derivadas de fagos, pero sin duda se necesitan estudios adicionales para transferir este conocimiento a la industria alimentaria. Por ejemplo, la aplicación de estos compuestos anti-biopelícula sería factible siempre que su aplicación pueda implementarse como parte de los procesos estándar de limpieza en las instalaciones industriales. Por lo tanto, el estudio de sinergia-antagonismo con desinfectantes y la efectividad a las temperaturas comúnmente utilizadas en la industria podría ser importante. Cabe señalar también los escasos datos disponibles sobre el uso de fagos y proteínas líticas contra biopelículas formadas por varias especies en superficies industriales de alimentos. Este vacío debe llenarse para profundizar en el control de las biopelículas bacterianas^[47].

Tabla 1. Artículos relacionados con la eliminación de biopelículas

Área	Autor, Año, [Ref]	Aplicación
Clínica	J. Nzakizwanayo <i>et al</i> , 2015 ^[43] .	Bacteriófagos previenen el bloqueo y la incrustación de <i>Proteus mirabilis</i> en catéteres urinarios
	E. J. Cano <i>et al</i> , 2021 ^[44] .	Actividad de fagos contra biopelículas de <i>klebsiella pneumoniae</i> en prósticos
	L. Khalifa <i>et al</i> , 2015 ^[45] .	Destrucción de biopelículas de <i>Enterococcus</i>
	M. Shlezinger <i>et al</i> , 2019 ^[46, 47] .	Formulación de bacteriófagos contra <i>E. faecalis</i> Tratamiento oral de patógenos mediante uso de fagos
Aguas	J. Mathieu <i>et al</i> , 2019 ^[49] .	Control bacteriano basado en fagos en diferentes componentes de los sistemas de tratamiento, distribución y reutilización del agua.
	Y. Zhan <i>et al</i> , 2023 ^[50] .	Tratamiento de biopelículas producidas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con bacteriófagos y cloroquinas en ductos acuáticos
	G. Goldman <i>et al</i> , 2009 ^[51] .	Reducción de la formación de biopelículas en membranas de ultrafiltración para el tratamiento de aguas
Alimentos	N. Adachi <i>et al</i> , 2012 ^[85] .	Control de bacterias que causan putrefacción de semillas y plántulas de arroz mediante fagos
	T. Abuladze <i>et al</i> , 2008 ^[79] .	Reducción de contaminación experimental mediante el uso de bacteriófagos en tomate, espinaca, brócoli y derivados cárnicos
	A. Vikram <i>et al</i> , 2020 ^[88] .	Biocontrol por fagos y sus aplicaciones en producción y procesamiento de alimentos

Tratamientos para Mejorar la Efectividad de los Fagos

FAGOS Y ANTIBIÓTICOS PARA LA DESTRUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS

La utilización de antibióticos para la remoción de biopelículas presenta limitaciones, debido a que si bien, se eliminan las bacterias metabólicamente activas que están sobre la superficie; las bacterias en estado sésil al interior de las biopelículas se ven poco afectadas, haciendo que el efecto del antibiótico no sea el adecuado, e influyendo a que en última instancia aparezcan subpoblaciones resistentes.

Como se ha mencionado previamente, los bacteriófagos tienen la capacidad de reducir las biopelículas y en la actualidad se ha empezado a explorar la actividad sinérgica de ambos tratamientos^[53 - 55]. Un ejemplo de ello es la utilización de fagos modificados para inhibir la red SOS en *E. coli* de forma tal que su inhibición aumenta la letalidad de las quinolonas, lo que demuestra que los fagos modificados pueden mejorar el efecto de los antibióticos en las biopelículas^[56]. Otro ejemplo del uso combinado de fagos y antibióticos se ha explorado en la disolución de las biopelículas de *S. taphylococcus aureus* y *P. aeruginosa*; se ha evidenciado que la combinación fago PEV20 y ciprofloxacina tiene un efecto antibacteriano sinérgico en la eliminación de biopelículas de *P. aeruginosa* en infecciones pulmonares y quemaduras y, a su vez, se reduce la necesidad de emplear altas concentraciones de ambos^[57]. Las investigaciones adelantadas han mostrado que al utilizar combinaciones de fagos y antibióticos, la proporción de ambos tratamientos y las condiciones de administración tienen un gran impacto en el efecto terapéutico. Por lo tanto, es importante determinar adecuadamente las condiciones de la combinación y garantizar su seguridad y eficacia^[58, 59].

ESTRATEGIA DE CÓCTELES DE FAGOS EN LA ELIMINACIÓN DE BIOPELÍCULAS

El uso combinado de diferentes bacteriófagos en forma de mezcla, también denominado cóctel de fagos ha mostrado ser una estrategia potencial para tratar la formación de biopelículas y sus problemas asociados. El uso de cócteles de fagos permite controlar de forma más efectiva un número mayor de bacterias, y se puede reducir de forma sustancial poblaciones resistentes. Hallazgos recientes han mostrado casos

exitosos en Europa y Estados Unidos, donde la utilización de un cóctel de fagos para el tratamiento de *P. aeruginosa* multirresistente mostró un mejor efecto, sin presentar antagonismo, en comparación con la utilización de un solo fago^[60]. A su vez, otros hallazgos de la utilización de los cócteles evidencian la reducción e inhibición la dispersión de la biopelícula por *P. aeruginosa* en condiciones bióticas y abióticas^[48]. En otros modelos bacterianos, como *K. pneumoniae* también se han reportado el uso de cócteles para controlar la formación de biopelículas^[61].

Finalmente, la modificación de fagos se plantea como uno de los campos prometedores para mejorar los tratamientos, en los cuales al emplear múltiples fagos efectivos y rápidos puedan generar mejores resultados.

PRODUCCIÓN DE LISINAS ASOCIADAS A BACTERIÓFAGOS COMO ESTRATEGIA DE ELIMINACIÓN

Las lisinas son enzimas derivadas de fagos que pueden degradar el peptidoglicano bacteriano y tienen un papel vital en el control de las biopelículas. Se han evaluado un número importante de lisinas y se ha reportado que la lisina CF-301 elimina biopelículas en una variedad de situaciones eliminando por completo las biopelículas de *S. aureus* que eran resistentes a altas concentraciones de antibióticos (daptomicina y ciprofloxacina)^[62]. La Lisina P128 es una proteína quimérica con una potente actividad anti-estafilocócica^[63] y posee un efecto destructor de la biopelícula producida por varios estafilococos^[64]. Se ha explorado también el intercambio de componentes estructurales de diferentes lisinas para construir con éxito proteínas con alta actividad bactericida y diferentes rangos de sustrato^[65]. Las combinaciones de lisinas y antibióticos tienen un efecto sinérgico en el tratamiento de las biopelículas de *Streptococcus* y se espera que se convierta en una nueva clase de fármacos anti-biopelícula^[66, 67]. Con respecto a bacterias Gram negativas también se han reportado lisinas con actividad frente a *Acinetobacter baumannii* multirresistente en modelos murinos^[68]. De igual manera, se han reportado otras proteínas diseñadas con efecto sobre la biopelícula de *Streptococcus mutans* in vitro e in vivo, el cual se espera sea un agente preventivo o terapéutico para el tratamiento de la caries dental [69]. Finalmente, esta amplia gama de investigaciones sobre las lisinas ha demostrado su capacidad potencial para tratar varias bacterias patógenas,

y se espera que se desarrolle como un fármaco alternativo para el control de biopelículas en el futuro^[70].

Otras aplicaciones en materia de bacteriófagos

USO DE BACTERIÓFAGOS EN SUPERFICIES

Con base en el uso potencial de bacteriófagos en varios contextos, también se ha explorado su papel como desinfectantes en el ambiente hospitalario, ya que dicho ambiente está colonizado por bacterias que potencialmente podrían causar infecciones en los pacientes hospitalizados. De hecho, la contaminación bacteriana persistente en las superficies representa la principal causa de transmisión de las llamadas infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), que son una de las complicaciones más frecuentes e importantes para los pacientes hospitalizados en todos los centros sanitarios del mundo. Varios estudios han demostrado que las superficies de los hospitales están permanentemente contaminadas por varios patógenos, que pueden transmitirse a los pacientes por contacto y causar infecciones^[71, 72]. Dentro de las especies bacterianas más frecuentes encontradas en superficies se describen: *Pseudomonas aeruginosa*^[73, 74], *Staphylococcus aureus* (incluido *S. aureus resistente a meticilina*, SARM)^[75] y *Escherichia coli*^[76], que además se encuentran entre los agentes etiológicos más frecuentes causando IAAS.

Los frecuentes procesos de contaminación, asociados con la presencia de pacientes colonizados o infectados, hacen que la eliminación de la contaminación superficial sea una tarea difícil, ya que los productos químicos presentan desventajas, como el efecto temporal, la capacidad de inducir resistencia a antibióticos como los productos de limpieza a base de amonio cuaternario^[77, 78] y la eliminación los microorganismos de forma indiscriminada, incluyendo bacterias potencialmente benéficas presentes en las superficies que suelen actuar como “centinelas”.

La idea de utilizar bacteriófagos como descontaminantes de superficies abióticas ya se ha explorado, y se han adelantado estudios in vitro con varias especies bacterianas. Por ejemplo, la utilización de un cóctel de bacteriófagos líticos frente a *E. coli* E157:H7 redujo significativamente las superficies contaminadas artificialmente con esta bacteria, como cubreobjetos de vi-

drio y las placas de yeso, elegidos como prototipos de materiales sólidos y porosos, respectivamente^[79]. De manera similar, se demostró que los cócteles de bacteriófagos líticos reducen significativamente la cantidad de *Salmonella* spp. en superficies de vidrio y acero inoxidable^[80]. Además, la actividad de descontaminación de fagos frente a otras bacterias asociadas a ambientes intrahospitalarios, como *Acinetobacter baumannii* resistente a múltiples fármacos y SARM se ha evaluado en superficies de vidrio^[81] fómites y ropa^[82]. Los resultados concuerdan en el potencial que presentan los fagos como descontaminantes de superficies. No obstante, aún se tienen ciertas limitaciones, ya que las condiciones experimentales distan un poco de los entornos reales de atención médica, ya que en la mayoría de los casos, los fagos se usaron frente altas densidades bacterianas que favorecen el encuentro fago-bacteria^[83], así mismo, se diluyeron en grandes volúmenes de solución acuosa, que son útiles para un contacto prolongado fago-bacteria pero que requieren que las superficies permanezcan húmedas por mucho tiempo y no son comparables con lo que sucede a nivel hospitalario^[79].

Finalmente, también se ha venido planteando la utilización de sistemas combinados de fagos con otros productos como probióticos y desinfectantes buscando un efecto sinérgico en las superficies. Los resultados de las pruebas in vitro han mostrado que los fagos combinados con probióticos aparte de mantener la estabilidad resultaron en una actividad de descontaminación más fuerte y más rápida en comparación con los probióticos y fagos usados de forma individual^[84].

USO DE BACTERIÓFAGOS COMO ESTRATEGIA EN CONTROL BIOLÓGICO

La forma en la cual los bacteriófagos invaden de forma específica a su hospedero y las herramientas enzimáticas que utilizan, hacen de estos unos candidatos ideales dentro del control biológico, especialmente en áreas como la agricultura, la que actualmente enfrenta grandes retos en temas de manejo fitopatológico ya que se empieza a reportar un número importante de bacterias resistentes a los tratamientos convencionales.

Estudios recientes muestran que los bacteriófagos son efectivos en la disminución del daño causado por bacterias fitopatógenas como *Burkholderia glumae* y *B.*

plantarii agentes causales de la pudrición de plantas de arroz^[85]; sin embargo, uno de los desafíos recae en que los bacteriófagos son sensibles a las condiciones ambientales, como la radiación solar, la temperatura y la desecación^[86], por lo que investigaciones recientes se han encaminado a desarrollar formulaciones de protección para aumentar la actividad residual e incrementar su eficacia y fiabilidad^[87].

En este sentido, se han evaluado diferentes bacteriófagos co-inoculados con leche descremada y bactericidas a base de cobre contra *Xanthomonas axonopodis* y *V. citri* agentes causales de antracnosis en cítricos de invernadero, reportando disminuciones importantes en la tasa de enfermedad, así mismo se han evaluado asociaciones de inoculación en rizomas^[86, 87] contra las bacterias fitopatógenas como *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas perforans* y *X. euvesicatoria*.

El biocontrol mediante fagos también está siendo aceptado como una tecnología limpia, segura, efectiva y específica al dirigir su acción contra bacterias patógenas presentes en las comidas, por lo que se han empezado a desarrollar y comercializar productos a base de fagos a nivel mundial contra un número importante de bacterias como *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp. y *Staphylococcus aureus*, entre otros. El biocontrol mediado por fagos supone una alternativa frente a los tratamientos tradicionales basados en químicos o alternativas de descontaminación basadas en radiación, en ese sentido el biocontrol específico permitiría la eliminación selectiva de bacterias patógenas alimentarias sin comprometer la microbiota beneficiosa de los alimentos, manteniendo de esta forma la composición microbiana natural preservando su componente nutricional^[88].

ALTERNATIVAS CONTRA BACTERIAS RESISTENTES

Los fagos infectan a sus huéspedes bacterianos de forma muy selectiva y esta propiedad se considera una ventaja sobre el uso de antibióticos tradicionales, ya que el tratamiento con fagos puede centrarse con precisión en el patógeno sin dañar la microbiota acompañante^[89]. No obstante, aunque se ha observado que las bacterias también podrían desarrollar resistencia a los fagos, su frecuencia es mucho menor^[90, 91], y se ha contrarrestado su emergencia cuando se utilizan cócteles de fagos^[52, 92]. Sin embargo, es un desafío obtener

un conjunto de fagos que sea efectivo contra todas las variantes de un patógeno dado^[52, 93]. Puede haber una compensación entre el rango de hospederos y la eficacia terapéutica de un cóctel para una especie específica de bacteria cuando: i) el número de fagos en un cóctel aumenta en un esfuerzo por incrementar el rango de hospederos, ii) el número de fagos contra un cepa específica de bacterias puede disminuir. Por lo tanto, la especificidad del huésped, aunque en teoría es beneficiosa, plantea un problema práctico cuando se combina con los fenotipos resistentes que puedan emerger.

Se plantea entonces una necesidad de adaptar fagos de forma personalizada de tal manera que se limite la presencia de fagos ineficaces y, por lo tanto, las prácticas de control se benefician de un uso racional y dirigido que se ajusten dependiendo contra que bacterias potenciales se esté enfrentando^[94].

La presencia de bacterias resistentes ha traspasado fronteras y su presencia no solo se ha relacionado con el entorno hospitalario^[95]. Las aguas residuales contienen una gran diversidad de microorganismos, incluyendo bacterias patógenas; así mismo, en ellas se descargan gran cantidad de antibióticos provenientes de las actividades antropogénicas que provocan la aparición continua de bacterias resistentes, lo que representa una gran amenaza para las especies y el medio ambiente^[96, 97].

TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

La contaminación de las plantas de tratamiento de aguas de consumo y residuales, por patógenos bacterianos transmitidos por el agua, representa un problema de salud mundial, no solo como resultado de la constante morbilidad y mortalidad ambiental que provoca, sino también por el alto costo de los métodos comunes de desinfección en las plantas de tratamiento, que incluyen procedimientos tanto físicos como químicos. Hay una serie de posibles patógenos bacterianos transmitidos por el agua que incluyen a bacterias como el *Vibrio*, *Campylobacter*, *E. coli* O157, *Salmonella* y *Shigella*^[98], que se sabe causan varias enfermedades con diferentes grados de severidad, y existe una necesidad urgente de encontrar métodos efectivos para contrarrestar su crecimiento y propagación sin impactar el medio ambiente o aumentar la resistencia a los antibióticos. En la búsqueda de enfoques ideales para disminuir los patógenos transmitidos por

el agua, los bacteriófagos se han considerado como indicadores de contaminación bacteriana y como buenos candidatos para el tratamiento de aguas residuales. La justificación del uso de fagos como indicadores se basa en su especificidad, por lo que se pueden usar bacteriófagos como trazadores efectivos de patógenos para monitorear y mejorar los métodos de desinfección. Por otra parte, se ha propuesto el uso directo de bacteriófagos con fines de descontaminación para la eliminación de bacterias en sistemas de tratamiento aeróbico ampliamente utilizados para reducir la cantidad de materia orgánica mediante el uso

de microorganismos como *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Campylobacter*, y para el control de la espuma^[99, 100]. Sin embargo, la aplicación efectiva del biocontrol de fagos para el tratamiento de aguas residuales requiere una comprensión total y completa de la dinámica de las comunidades microbianas, ya que estas poblaciones varían entre diferentes plantas, y por esta razón es importante seleccionar y usar fagos específicos capaces de atacar patógenos bacterianos no deseados.

En la figura 4 se describen las principales aplicaciones de los bacteriófagos en las diferentes áreas de la clínica, la industria y el ambiente.

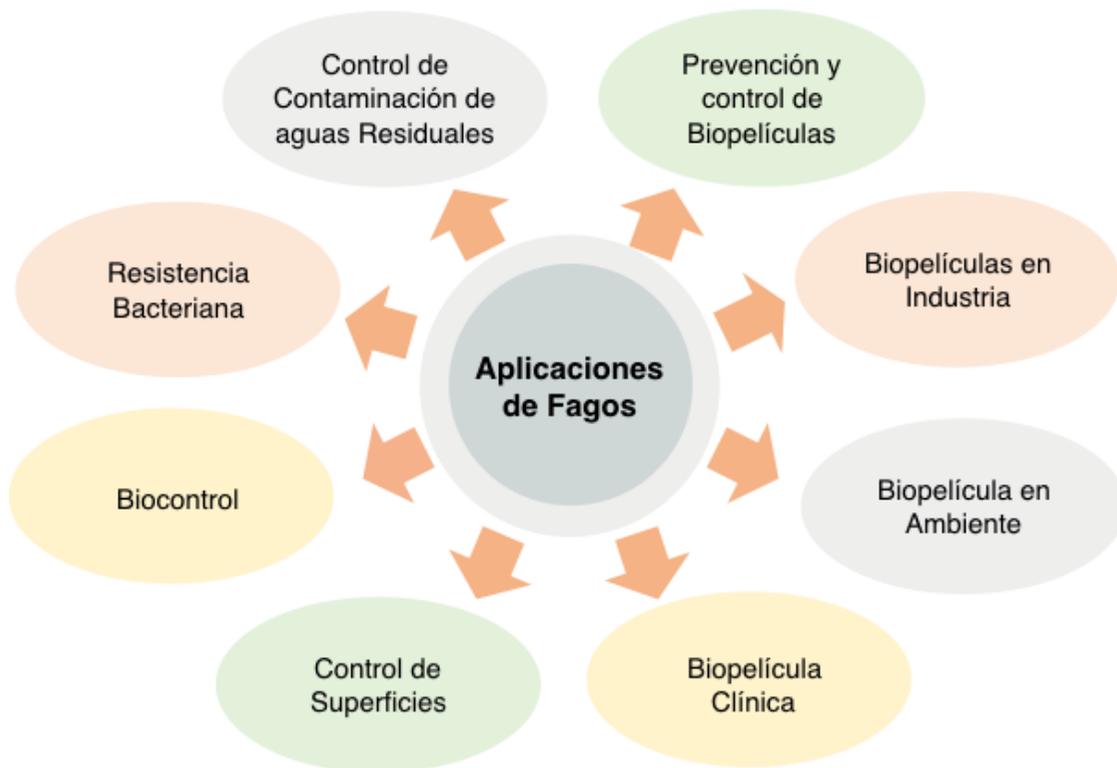


Figura 4. Aplicaciones

Conclusiones

En la literatura científica se evidencia el uso potencial de los bacteriófagos como una estrategia de control en importantes y diferentes contextos. Los resultados relacionados con el uso de bacteriófagos para la disminución o remoción de biopelículas, en sectores de

la medicina, la agricultura y la industria son bastante prometedores. En la industria alimentaria el uso de fagos ya está aprobado y en vigor, no obstante en otras áreas, todavía deben resolverse algunos problemas técnicos antes de que los fagos puedan usarse ampliamente como descontaminantes. En conjunto,

los resultados informados abren el camino a nuevas e interesantes perspectivas para mejorar la salud humana, procesos industriales y al mismo tiempo, obtener un medio ambiente más saludable.

Fuentes de financiación: Proyecto MinCiencias: Código 111589785393; Financiación Escuela de Microbiología Proyecto: 2021-39930

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Bibliografía

- [1] **Abedon ST, Thomas-Abedon C, Thomas A, Mazure H.** Bacteriophage prehistory: Is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Bacteriophage*. 2011;1(3):174-178. DOI: 10.4161/BACT.1.3.16591.
- [2] **Summers WC.** Félix Hubert d'Herelle (1873-1949): History of a scientific mind. *Bacteriophage*. 2017; 6(4):e1270090. DOI: 10.1080/21597081.2016.1270090
- [3] **Beckerich A, Hauduroy P.** Le Bacteriophage de d'Herelle: Ses Applications Therapeutiques. *J Bacteriol*. 1923; 8(2):163-71. DOI: 10.1128/jb.8.2.163-171.1923.
- [4] **Ho K.** Bacteriophage therapy for bacterial infections. Rekindling a memory from the pre-antibiotics era. *Perspect Biol Med*. 2001; 44(1):1-16. DOI: 10.1353/pbm.2001.0006.
- [5] **Myelnikov D.** An Alternative Cure: The Adoption and Survival of Bacteriophage Therapy in the USSR, 1922-1955. *J Hist Med Allied Sci*. 2018; 73(4):385-411. DOI: 10.1093/jhmas/jry024.
- [6] **Gordillo Altamirano FL, Barr JJ.** Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clin Microbiol Rev*. 2019; 32(2):e00066-18. DOI: 10.1128/CMR.00066-18.
- [7] **Ackermann HW, Prangishvili D.** Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch Virol*. 2012; 157(10):1843-9. DOI: 10.1007/s00705-012-1383-y
- [8] **Kutter E, Sulakvelidze A,** directeurs. *Bacteriophages*. 0 éd. CRC Press; 2004. DOI: 10.1201/9780203491751.
- [9] **Pires DP, Oliveira H, Melo LD, Sillankorva S, Azeredo J.** Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(5):2141-51. DOI: 10.1007/s00253-015-7247-0
- [10] **Barbirz S, Becker M, Freiberg A, Seckler R.** Phage tail-spike proteins with beta-solenoid fold as thermostable carbohydrate binding materials. *Macromol Biosci*. 2009; 9(2):169-73. DOI: 10.1002/mabi.200800278.
- [11] **Moak M, Molineux IJ.** Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions. *Mol Microbiol*. 2004; 51(4):1169-83. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03894.x.
- [12] **Rodríguez-Rubio L, Martínez B, Donovan DM, Rodríguez A, García P.** Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzymiotics. *Crit Rev Microbiol*. 2013;39(4):427-34. DOI: 10.3109/1040841X.2012.723675.
- [13] **Fischetti VA.** Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(5):393-400. DOI: 10.1016/j.mib.2008.09.012.
- [14] **Briers Y, Walmagh M, Van Puyenbroeck V, Cornelissen A, Cenens W, Aertsen A, Oliveira H, Azeredo J, Verween G, Pirnay JP, Miller S, Volckaert G, Lavigne R.** Engineered endolysin-based "Artilylins" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. *mBio*. 2014;5(4):e01379-14. DOI: 10.1128/mBio.01379-14.
- [15] **Nelson DC, Schmelcher M, Rodriguez-Rubio L, Klumpp J, Pritchard DG, Dong S, Donovan DM.** Endolysins as antimicrobials. *Adv Virus Res*. 2012;83:299-365. DOI: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00007-4.
- [16] **García P, Rodríguez L, Rodríguez A, Martínez B.** Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends Food Sci Technol*. 2010;21(8):373-382. DOI: 10.1016/J.TIFS.2010.04.010.
- [17] **Donlan RM.** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(9):881-90. DOI: 10.3201/eid0809.020063.
- [18] **Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ.** How bacteria stick. *Sci Am*. 1978 Jan;238(1):86-95. Doi: 10.1038/scientificamerican0178-86.
- [19] **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318.
- [20] **Halan B, Buehler K, Schmid A.** Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends Biotechnol*. 2012;30(9):453-65. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.05.003.
- [21] **Flemming H-C, Wingender J.** The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(9):623-33. DOI: 10.1038/nrmicro2415.
- [22] **Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO.** Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem*. 2015;7(4):493-512. DOI: 10.4155/fmc.15.6.
- [23] **Palmer J, Flint S, Brooks J.** Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2007;34(9):577-88. DOI: 10.1007/s10295-007-0234-4.
- [24] **Moormeier DE, Bayles KW.** *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol*. 2017;104(3):365-376. DOI: 10.1111/mmi.13634.
- [25] **Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y, Nomura N.** Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2016;80(1):7-12. DOI: 10.1080/09168451.2015.1058701.

- [26] **Tolker-Nielsen T.** Biofilm Development. *Microbiol Spectr.* 2015;3(2):MB-0001-2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014.
- [27] **McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S.** Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol.* 2011;10(1):39-50. DOI: 10.1038/nrmicro2695.
- [28] **Purevdorj-Gage B, Costerton WJ,** Stoodley P. Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiology (Reading).* 2005;151(Pt 5):1569-1576. DOI: 10.1099/mic.0.27536-0.
- [29] **Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C.** Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014;78(3):510-43. DOI: 10.1128/MMBR.00013-14.
- [30] **Hughes G, Webber MA.** Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. *Br J Pharmacol.* 2017;174(14):2237-2246. DOI: 10.1111/bph.13706.
- [31] **Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, Prévost G, Bernardi T, Jehl F.** Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Front Microbiol.* 2020;10:2894. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02894.
- [32] **Al-Wrafiy F, Brzozowska E, Górska S, Gamian A.** Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2017;71(0):78-91. DOI: 10.5604/01.3001.0010.3792.
- [33] **Yan Z, Huang M, Melander C, Kjellerup BV.** Dispersal and inhibition of biofilms associated with infections. *J Appl Microbiol.* 2020;128(5):1279-1288. Doi: 10.1111/jam.14491.
- [34] **Muziasari WI, Pitkänen LK, Sørum H, Stedtfeld RD, Tiedje JM, Virta M.** The Resistome of Farmed Fish Feces Contributes to the Enrichment of Antibiotic Resistance Genes in Sediments below Baltic Sea Fish Farms. *Front Microbiol.* 2017;7:2137. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02137.
- [35] **Wang J, Liu Q, Wu B, Zhao F, Ma S, Hu H, Zhang X, Ren H.** Quorum sensing signaling distribution during the development of full-scale municipal wastewater treatment biofilms. *Sci Total Environ.* 2019;685:28-36. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.249.
- [36] **Fan X, Li W, Zheng F, Xie J.** Bacteriophage inspired antibiotics discovery against infection involved biofilm. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2013;23(4):317-26. DOI: 10.1615/critreveukaryotgeneexpr.2013007717.
- [37] **Ojha A, Anand M, Bhatt A, Kremer L, Jacobs WR Jr, Hatfull GF.** GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell.* 2005;123(5):861-73. Doi: 10.1016/j.cell.2005.09.012.
- [38] **Karatan E, Watnick P.** Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009;73(2):310-47. DOI: 10.1128/MMBR.00041-08.
- [39] **Lu TK, Collins JJ.** Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(27):11197-202. DOI: 10.1073/pnas.0704624104.
- [40] **Hanlon GW, Denyer SP, Olliff CJ, Ibrahim LJ.** Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 200;67(6):2746-53. DOI: 10.1128/AEM.67.6.2746-2753.2001.
- [41] **Pei R, Lamas-Samanamud GR.** Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing quorum-quenching enzymes. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(17):5340-8. DOI: 10.1128/AEM.01434-14
- [42] **Brüssow H.** Bacteriophage-host interaction: from splendid isolation into a messy reality. *Curr Opin Microbiol.* 2013 Aug;16(4):500-6. DOI: 10.1016/j.mib.2013.04.007.
- [43] **Nzakizwanayo J, Hanin A, Alves DR, McCutcheon B, Dedi C, Salvage J, Knox K, Stewart B, Metcalfe A, Clark J, Gilmore BF, Gahan CG, Jenkins AT, Jones BV.** Bacteriophage Can Prevent Encrustation and Blockage of Urinary Catheters by *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;60(3):1530-6. DOI: 10.1128/AAC.02685-15.
- [44] **Cano EJ, Cafilisch KM, Bollyky PL, Van Belleghem JD, Patel R, Fackler J, Brownstein MJ, Horne B, Biswas B, Henry M, Malagon F, Lewallen DG, Suh GA.** Phage Therapy for Limb-threatening Prosthetic Knee *Klebsiella pneumoniae* Infection: Case Report and In Vitro Characterization of Anti-biofilm Activity. *Clin Infect Dis.* 2021;73(1):e144-e151. DOI: 10.1093/cid/ciaa705
- [45] **Khalifa L, Brosh Y, Gelman D, Copenhagen-Glazer S, Beyth S, Poradosu-Cohen R, Que YA, Beyth N, Hazan R.** Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Apr;81(8):2696-705. Doi: 10.1128/AEM.00096-15.
- [46] **Shlezinger M, Friedman M, Hourri-Haddad Y, Hazan R, Beyth N.** Phages in a thermoreversible sustained-release formulation targeting *E. faecalis* in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2019;14(7):e0219599. DOI: 10.1371/journal.pone.0219599.
- [47] **Shlezinger M, Khalifa L, Hourri-Haddad Y, Copenhagen-Glazer S, Resch G, Que YA, Beyth S, Dorfman E, Hazan R, Beyth N.** Phage Therapy: A New Horizon in the Antibacterial Treatment of Oral Pathogens. *Curr Top Med Chem.* 2017;17(10):1199-1211. DOI: 10.2174/1568026616666160930145649.
- [48] **Alves DR, Perez-Esteban P, Kot W, Bean JE, Arnot T, Hansen LH, Enright MC, Jenkins AT.** A novel

- bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions. *Microb Biotechnol.* 2016;9(1):61-74. DOI: 10.1111/1751-7915.12316.
- [49] **Mathieu J, Yu P, Zuo P, Da Silva MLB, Alvarez PJJ.** Going Viral: Emerging Opportunities for Phage-Based Bacterial Control in Water Treatment and Reuse. *Acc Chem Res.* 2019;52(4):849-857. DOI: 10.1021/acs.accounts.8b00576
- [50] **Zhang Y, Hu Z.** Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine. *Biotechnol Bioeng.* 2013;110(1):286-95. DOI: 10.1002/bit.24630.
- [51] **Goldman G, Starosvetsky J, Armon R.** Inhibition of biofilm formation on UF membrane by use of specific bacteriophages. *J Memb Sci.* 2009;342(1-2):145-52. DOI: 10.1016/j.memsci.2009.06.036.
- [52] **Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C.** Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol.* 2013;8(6):769-83. DOI: 10.2217/fmb.13.47.
- [53] **Coulter LB, McLean RJ, Rohde RE, Aron GM.** Effect of bacteriophage infection in combination with tobramycin on the emergence of resistance in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Viruses.* 2014;6(10):3778-86. DOI: 10.3390/v6103778.
- [54] **Kumaran D, Taha M, Yi Q, Ramirez-Arcos S, Diallo JS, Carli A, Abdelbary H.** Does Treatment Order Matter? Investigating the Ability of Bacteriophage to Augment Antibiotic Activity against *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Front Microbiol.* 2018;9:127. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00127.
- [55] **Shlezinger M, Copenhagen-Glazer S, Gelman D, Beyth N, Hazan R.** Eradication of Vancomycin-Resistant Enterococci by Combining Phage and Vancomycin. *Viruses.* 2019;11(10):954. DOI: 10.3390/v11100954.
- [56] **Lu TK, Collins JJ.** Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(12):4629-34. DOI: 10.1073/pnas.0800442106.
- [57] **Chang RYK, Das T, Manos J, Kutter E, Morales S, Chan HK.** Bacteriophage PEV20 and Ciprofloxacin Combination Treatment Enhances Removal of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Isolated from Cystic Fibrosis and Wound Patients. *AAPS J.* 2019;21(3):49. DOI: 10.1208/s12248-019-0315-0.
- [58] **Casey E, van Sinderen D, Mahony J.** In Vitro Characteristics of Phages to Guide 'Real Life' Phage Therapy Suitability. *Viruses.* 2018;10(4):163. DOI: 10.3390/v10040163.
- [59] **Tagliaferri TL, Jansen M, Horz HP.** Fighting Pathogenic Bacteria on Two Fronts: Phages and Antibiotics as Combined Strategy. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:22. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00022.
- [60] **Latz S, Krüttgen A, Häfner H, Buhl EM, Ritter K, Horz HP.** Differential Effect of Newly Isolated Phages Belonging to PB1-Like, phiKZ-Like and LUZ24-Like Viruses against Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* under Varying Growth Conditions. *Viruses.* 2017;9(11):315. DOI: 10.3390/v9110315.
- [61] **Wu Y, Wang R, Xu M, Liu Y, Zhu X, Qiu J, Liu Q, He P, Li Q.** A Novel Polysaccharide Depolymerase Encoded by the Phage SH-KP152226 Confers Specific Activity Against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* via Biofilm Degradation. *Front Microbiol.* 2019;10:2768. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02768.
- [62] **Schuch R, Khan BK, Raz A, Rotolo JA, Wittekind M.** Bacteriophage Lysin CF-301, a Potent Antistaphylococcal Biofilm Agent. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(7):e02666-16. DOI: 10.1128/AAC.02666-16.
- [63] **Paul VD, Rajagopalan SS, Sundararajan S, George SE, Asrani JY, Pillai R, Chikkamadaiah R, Durgaiah M, Sriram B, Padmanabhan S.** A novel bacteriophage Tail-Associated Muralytic Enzyme (TAME) from Phage K and its development into a potent antistaphylococcal protein. *BMC Microbiol.* 2011;11:226. DOI: 10.1186/1471-2180-11-226.
- [64] **Poonacha N, Nair S, Desai S, Tuppad D, Hiremath D, Mohan T, Vipra A, Sharma U.** Efficient Killing of Planktonic and Biofilm-Embedded Coagulase-Negative Staphylococci by Bactericidal Protein P128. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(8):e00457-17. DOI: 10.1128/AAC.00457-17.
- [65] **Díez-Martínez R, De Paz HD, García-Fernández E, Bustamante N, Euler CW, Fischetti VA, Menéndez M, García P.** A novel chimeric phage lysin with high in vitro and in vivo bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(6):1763-73. DOI: 10.1093/jac/dkv038.
- [66] **Meng X, Shi Y, Ji W, Meng X, Zhang J, Wang H, Lu C, Sun J, Yan Y.** Application of a bacteriophage lysin to disrupt biofilms formed by the animal pathogen *Streptococcus suis*. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(23):8272-9. DOI: 10.1128/AEM.05151-11.
- [67] **Rios AC, Moutinho CG, Pinto FC, Del Fiol FS, Jozala A, Chaud MV, Vila MM, Teixeira JA, Balcão VM.** Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiol Res.* 2016;191:51-80. DOI: 10.1016/j.micres.2016.04.008.
- [68] **Lood R, Winer BY, Pelzek AJ, Diez-Martinez R, Thandar M, Euler CW, Schuch R, Fischetti VA.** Novel phage lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* in a mouse bacteremia model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(4):1983-91. DOI: 10.1128/AAC.04641-14.
- [69] **ang H, Bi Y, Shang X, Wang M, Linden SB, Li Y, Li Y, Nelson DC, Wei H.** Antibiofilm Activities of a Novel Chimeolysin against *Streptococcus mutans* under

- Physiological and Cariogenic Conditions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(12):7436-7443. DOI: 10.1128/AAC.01872-16.
- [70] **Vázquez R, García P.** Synergy Between Two Chimeric Lysins to Kill *Streptococcus pneumoniae*. *Front Microbiol.* 2019;10:1251. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01251.
- [71] **Allegranzi B, Bagheri Nejad S, Combescure C, Grafmans W, Attar H, Donaldson L, Pittet D.** Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2011;377(9761):228-41. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61458-4.
- [72] **Otter JA, Yezli S, Salkeld JA, French GL.** Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am J Infect Control.* 2013;41(5 Suppl):S6-11. DOI: 10.1016/j.ajic.2012.12.004.
- [73] **Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT.** *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018;58(4):428-439. DOI: 10.1165/rcmb.2017-0321TR.
- [74] **Pachori P, Goyalwal R, Gandhi P.** Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis.* 2019;6(2):109-119. DOI: 10.1016/j.gendis.2019.04.001.
- [75] **DeLeo FR, Chambers HF.** Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2464-74. DOI: 10.1172/JCI38226.
- [76] **Larramendy S, Deglaire V, Dusollier P, Fournier JP, Caillon J, Beaudeau F, Moret L.** Risk Factors of Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Producing *Escherichia coli* Community Acquired Urinary Tract Infections: A Systematic Review. *Infect Drug Resist.* 2020;13:3945-3955. DOI: 10.2147/IDR.S269033.
- [77] **Caselli E, D'Accolti M, Vandini A, Lanzoni L, Camedra MT, Coccagna M, Branchini A, Antonioli P, Balboni PG, Di Luca D, Mazzacane S.** Impact of a Probiotic-Based Cleaning Intervention on the Microbiota Ecosystem of the Hospital Surfaces: Focus on the Resistome Remodulation. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148857. Doi: 10.1371/journal.pone.0148857.
- [78] **Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM.** Mechanisms of Increased Resistance to Chlorhexidine and Cross-Resistance to Colistin following Exposure of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to Chlorhexidine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;61(1):e01162-16. DOI: 10.1128/AAC.01162-16.
- [79] **Abuladze T, Li M, Menetrez MY, Dean T, Senecal A, Sulakvelidze A.** Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(20):6230-8. DOI: 10.1128/AEM.01465-08.
- [80] **Woolston J, Parks AR, Abuladze T, Anderson B, Li M, Carter C, Hanna LF, Heyse S, Charbonneau D, Sulakvelidze A.** Bacteriophages lytic for *Salmonella* rapidly reduce *Salmonella* contamination on glass and stainless steel surfaces. *Bacteriophage.* 2013;3(3):e25697. Doi: 10.4161/bact.25697.
- [81] **Chen LK, Liu YL, Hu A, Chang KC, Lin NT, Lai MJ, Tseng CC.** Potential of bacteriophage ΦAB2 as an environmental biocontrol agent for the control of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol.* 2013;13:154. DOI: 10.1186/1471-2180-13-154.
- [82] **K. C. Jensen et al.,** "Isolation and Host Range of Bacteriophage with Lytic Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Potential Use as a Fomite Decontaminant," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, Jul. 2015, Doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0131714.
- [83] **Jensen KC, Hair BB, Wienclaw TM, Murdock MH, Hatch JB, Trent AT, White TD, Haskell KJ, Berges BK.** Isolation and Host Range of Bacteriophage with Lytic Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Potential Use as a Fomite Decontaminant. *PLoS One.* 2015;10(7):e0131714. DOI: 10.1371/journal.pone.0131714.
- [84] **D'Accolti M, Soffritti I, Piffanelli M, Bisi M, Mazzacane S, Caselli E.** Efficient removal of hospital pathogens from hard surfaces by a combined use of bacteriophages and probiotics: potential as sanitizing agents. *Infect Drug Resist.* 2018;11:1015-1026. DOI: 10.2147/IDR.S170071.
- [85] **Adachi N, Tsukamoto S, Inoue Y, Azegami K.** Control of Bacterial Seedling Rot and Seedling Blight of Rice by Bacteriophage. *Plant Dis.* 2012 Jul;96(7):1033-1036. Doi: 10.1094/PDIS-03-11-0232-RE.
- [86] **Iriarte FB, Balogh B, Momol MT, Smith LM, Wilson M, Jones JB.** Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(6):1704-11. DOI: 10.1128/AEM.02118-06
- [87] **Balogh B, Jones JB, Iriarte FB, Momol MT.** Phage therapy for plant disease control. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010;11(1):48-57. DOI: 10.2174/138920110790725302.
- [88] **Vikram A, Woolston J, Sulakvelidze A.** Phage Biocontrol Applications in Food Production and Processing. *Curr Issues Mol Biol.* 2021;40:267-302. DOI 10.21775/cimb.040.267.
- [89] **Loc-Carrillo C, Abedon ST.** Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage.* 2011;1(2):111-114. DOI: 10.4161/bact.1.2.14590.
- [90] **Labrie SJ, Samson JE, Moineau S.** Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(5):317-27. DOI: 10.1038/nrmicro2315.
- [91] **Hyman P, Abedon ST.** Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol.* 2010;70:217-48. DOI: 10.1016/S0065-2164(10)70007-1.

- [92] Skurnik M, Pajunen M, Kiljunen S. Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol Lett.* 2007;29(7):995-1003. DOI: 10.1007/s10529-007-9346-1.
- [93] Pirnay JP, De Vos D, Verbeken G, Merabishvili M, Chanishvili N, Vanechoutte M, Zizi M, Laire G, Lavigne R, Huys I, Van den Mooter G, Buckling A, Debarbieux L, Pouillot F, Azeredo J, Kutter E, Dublanquet A, Górski A, Adamia R. The phage therapy paradigm: prêt-à-porter or sur-mesure? *Pharm Res.* 2011;28(4):934-7. DOI: 10.1007/s11095-010-0313-5.
- [94] Keen EC. Phage therapy: concept to cure. *Front Microbiol.* 2012;3:238. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00238.
- [95] Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(12):1057-98. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.
- [96] Cabello FC, Godfrey HP, Tomova A, Ivanova L, Dölz H, Millanao A, Buschmann AH. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ Microbiol.* 2013;15(7):1917-42. DOI: 10.1111/1462-2920.12134.
- [97] Tomova A, Ivanova L, Buschmann AH, Rioseco ML, Kalsi RK, Godfrey HP, Cabello FC. Antimicrobial resistance genes in marine bacteria and human uropathogenic *Escherichia coli* from a region of intensive aquaculture. *Environ Microbiol Rep.* 2015;7(5):803-9. DOI: 10.1111/1758-2229.12327.
- [98] Ramírez-Castillo FY, Loera-Muro A, Jacques M, Garneau P, Avelar-González FJ, Harel J, Guerrero-Barrera AL. Waterborne pathogens: detection methods and challenges. *Pathogens.* 2015;4(2):307-34. DOI: 10.3390/pathogens4020307.
- [99] Jassim SA, Limoges RG, El-Cheikh H. Bacteriophage biocontrol in wastewater treatment. *World J Microbiol Biotechnol.* 2016 Apr;32(4):70. DOI: 10.1007/s11274-016-2028-1.
- [100] Pal P, Khairnar K. and Paunikar W. N. Causes and remedies for filamentous foaming in activated sludge treatment plant. *Global NEST Journal.* 2014;16(4):762-72. DOI: 10.30955/gnj.001273.