



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COMO AGENTES REDUCTORES DE  
CONTAMINACIÓN: APLICACIÓN EN MAYONESA CASERA CONTAMINADA  
CON *Salmonella* Enteritidis.

KARINA ANDREA YÉVENES COA

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESORA GUÍA: CONSUELO BORIE POLANCO

SANTIAGO, CHILE

2015



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COMO AGENTES REDUCTORES DE  
CONTAMINACIÓN: APLICACIÓN EN MAYONESA CASERA CONTAMINADA  
CON *Salmonella* Enteritidis.

KARINA ANDREA YÉVENES COA

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
Profesora Guía : Consuelo Borie Polanco	.....	.....
Profesor Corrector : James Robeson Camus	.....	.....
Profesor Corrector : José Yañez López	.....	.....

SANTIAGO, CHILE

2015

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la vida por permitirme seguir.

A toda mi familia, componente fundamental en esta etapa.

A la Doctora Borie, por sus enseñanzas, dedicación y compromiso con mi tesis.

A mis profesores correctores el Dr. James Robeson y Dr. José Manuel Yañez.

A todos los integrantes del laboratorio de microbiología que me ayudaron en la parte experimental, administrativa y más.

y a mis amigas (os) los que siempre me dieron ánimo para seguir y estuvieron conmigo.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>2</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>8</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>8</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>8</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
1. Cepa bacteriana .....	9
2. Bacteriófagos .....	9
3. Matriz alimentaria .....	9
4. Diseño experimental .....	10
4.1 Cálculo de dosis bacteriana .....	10
4.2 Preparación del inóculo bacteriano .....	10
4.3 Contaminación de las muestras con la cepa desafío y aplicación de la mezcla de bacteriófagos .....	10
4.4 Bacteriología cuantitativa (recuento de SE) .....	11
4.5 Bacteriología cualitativa (detección de SE) .....	12
5. Análisis estadístico .....	12
6. Normas de bioseguridad .....	12
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>13</b>
1. Cálculo de dosis bacteriana .....	13
2. Bacteriología cualitativa: mayonesa casera .....	13
3. Análisis de varianza .....	13
4. Bacteriología cuantitativa: mayonesa casera mantenida a temperatura ambiente ...	14
5. Bacteriología cuantitativa: mayonesa casera mantenida a temperatura de refrigeración .....	15
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>23</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>24</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>28</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla Nro. 1.** Recuentos promedio de *Salmonella* Enteritidis en mayonesa casera, con y sin tratamiento de fagos, almacenada a temperatura ambiente, según tiempo de incubación.....14

**Tabla Nro. 2.** Recuentos promedio de *Salmonella* Enteritidis en mayonesa casera, con y sin tratamiento de fagos, almacenada a temperatura de refrigeración, según tiempo de incubación.....15

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura Nro. 1.</b> Ciclo lítico y lisogénico de un bacteriófago.....	4
<b>Figura Nro. 2.</b> Transducción por un bacteriófago.....	5

## RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos siguen siendo una amenaza para la salud pública a nivel mundial. En Chile, *Salmonella* Enteritidis (SE) es uno de los agentes bacterianos más aislados, detectándose principalmente en la carne de ave, los huevos y sus derivados.

A pesar de que el país cuenta con un programa nacional de control de *Salmonella* sp. en aves de postura y se han tomado medidas como prohibir la venta de mayonesa casera, el consumo de ovoproductos elaborados artesanalmente, especialmente la mayonesa, sigue siendo un riesgo para la salud pública, de esta forma, sería importante contar con medidas complementarias a las actuales para poder controlar a este patógeno. Una de estas medidas sería el uso de bacteriófagos.

Este estudio pretendió evaluar la capacidad de una mezcla de bacteriófagos líticos para reducir los recuentos de SE en mayonesa casera experimentalmente contaminada e incubada a dos temperaturas diferentes.

Para llevar a cabo este objetivo se trabajó con dos grupos de 24 muestras cada uno, de 25 mL de mayonesa. El primer grupo, grupo experimental, fue contaminado con SE y recibió una mezcla de cinco bacteriófagos líticos, utilizando una MOI de  $10^5$ . El segundo grupo, grupo control, fue contaminado únicamente con SE. Ambos grupos fueron mantenidos a temperatura ambiente y de refrigeración, y la dosis de contaminación con SE varió según la temperatura de incubación. Todas las muestras fueron incubadas durante 72 horas, realizando recuentos de SE a las 24 y 72 horas.

Al término de las 72 horas, en todos los grupos experimentales se observó que la mezcla de bacteriófagos líticos logró disminuir los recuentos bacterianos, con reducciones significativas ( $p < 0,0001$ ), independiente del tiempo y periodo de incubación. Las mayores reducciones fueron evidenciadas a las 72 horas en las muestras incubadas a temperatura ambiente, obteniéndose una reducción de  $3 \log_{10}$  UFC/mL, y a las 24 horas en las muestras mantenidas a temperatura de refrigeración, con una disminución en el recuento de  $2,97 \log_{10}$  UFC/mL.

Con los resultados obtenidos se concluye que la mezcla de cinco bacteriófagos líticos reduce efectivamente el recuento de SE en la mayonesa casera, por lo que esta mezcla podría ser considerada como una herramienta de biocontrol en inocuidad alimentaria.

Palabras claves: *Salmonella* Enteritidis, bacteriófagos, biocontrol, mayonesa.



## ABSTRACT

*Foodborne diseases are still a threat for the public health worldwide. In Chile, Salmonella Enteritidis (SE) is one of the most isolated bacterial agents, detected mainly in poultry, eggs and their derivatives.*

*Although the country has a national control program for Salmonella sp. in laying hens and there have been taken measures as forbid the sale of homemade mayonnaise, the egg products consumption, especially mayonnaise, remains as a risk for public health, therefore, it would be important to have complementary measurements to control this pathogen. One of these measurements would be the use of bacteriophages.*

*This study intends to evaluate the ability of a mixture of lytic bacteriophages to reduce SE counts in experimentally contaminated homemade mayonnaise and incubated to two different temperatures.*

*To fulfil this objective, the experiment considered two groups of 24 samples each with 25 mL of homemade mayonnaise. The first group, the experimental, was contaminated with SE and added with a mixture of five lytic bacteriophages, using a MOI of  $10^5$ . The second group, the control, was contaminated with SE only. Both groups were kept under room temperature and refrigeration temperature, and the dose of contamination with SE varied according incubation temperature. All the samples were incubated during 72 hours and there were two measurements of SE counts; the first one at 24 hours and the second one at 72 hours.*

*At the end of 72 hours it was observed that the mixture of lytic bacteriophages decreased the bacterial counts, with significant reductions ( $p < 0.0001$ ) in all experimental groups, independent of the time and incubation period. The greatest reductions were evidenced at 72 hours in the samples incubated at room temperature, achieving a reduction of  $3 \log_{10}$  CFU /mL, and at 24 hours in the samples incubated at refrigeration temperature, with a decrease of  $2.97 \log_{10}$  CFU / mL.*

*With the results obtained in this study, it is concluded that the mixture of five lytic bacteriophages reduce effectively SE counts in homemade mayonnaise. Therefore this*

*mixture of lytic bacteriophages could be considerate as a biocontrol tool in food safety.*

*Key words: Salmonella Enteritidis, bacteriophage, biocontrol, mayonnaise.*

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos continúan siendo una amenaza para la salud pública y una causa importante de morbimortalidad a nivel mundial, generando múltiples impactos socioeconómicos a nivel de la salud humana, planteles productivos y en la industria de alimentos. Éstas han ido en aumento en las últimas décadas debido a la migración poblacional, que conlleva a cambios tanto en el sistema de vida como en los hábitos alimenticios y a la persistencia y reemergencia de patógenos.

Al igual que en los países europeos, en Chile, de todos los brotes notificados, *Salmonella* sp. es uno de los agentes bacterianos más aislados, siendo el serotipo Enteritidis el más frecuente. Según el Instituto de Salud Pública de Chile la detección de *Salmonella* Enteritidis en alimentos se concentra principalmente en la carne de ave, los huevos y sus derivados.

Dado que los tratamientos físicos y químicos que ha implementado la industria alimentaria para inactivar bacterias en los alimentos, pueden alterar las características organolépticas de éstos y el uso de antibióticos está cada vez más cuestionado, ya que favorece la selección de bacterias resistentes, es que actualmente ha generado mucho interés la utilización de bacteriófagos en la industria de alimentos como una herramienta complementaria de biocontrol.

Los bacteriófagos son virus ampliamente distribuidos en el mundo, que infectan y lisan exclusivamente a bacterias y podrían ser considerados como una medida prometedora para la descontaminación de alimentos ya que son componentes naturales, no son tóxicos, son de bajo costo, no alteran las características organolépticas del alimento y se pueden utilizar en todas las etapas de la cadena alimentaria.

El presente trabajo pretendió evaluar la efectividad del uso de una mezcla de bacteriófagos líticos en la reducción de la contaminación con *Salmonella* Enteritidis en mayonesa casera mantenida a temperatura ambiente y de refrigeración.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, constituido por bacterias gram negativas, anaerobias facultativas y flageladas. Están ampliamente distribuidas en el medio ambiente y son los principales microorganismos asociados a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). La salmonelosis se contrae generalmente por el consumo de alimentos contaminados, pudiendo provocar fiebre, gastroenteritis y bacteremia, entre otros (Pui *et al.*, 2011).

Según la última información entregada por el Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud y su departamento de Estadísticas e Información de Salud, desde enero hasta el 30 de diciembre del 2013 se notificaron 1.126 brotes de ETA con 6.646 casos. Los principales alimentos involucrados en estos brotes fueron comidas y platos preparados (38,8%), pescados y productos de la pesca (33,5%), carnes y productos cárneos (7,8%) y huevos y ovoproductos (5,7%). El lugar de consumo del alimento fue conocido en el 93,7% de los brotes y de éstos el 46% fue en el hogar, el 20,9% en restaurantes, el 15,3% en casinos, clubes sociales y cocinería, y el 17,8 % se relacionó con ferias libres y mercados, entre otros. En el 33,1% del total de brotes de este periodo se logró identificar un agente causal, de los cuales un 58,4% correspondió a *Salmonella* sp. En los brotes en que se logró aislar a este agente, los alimentos involucrados fueron comidas y platos preparados (49,1%), seguido de huevos y ovoproductos (13,4%) (MINSAL, 2013).

Actualmente el país cuenta con un programa nacional de control de *Salmonella* sp. en aves de postura, el cual contempla medidas de control tales como la vacunación, uso de antibióticos, ácidos orgánicos, exclusión competitiva y estrictas normas de bioseguridad (SAG, 2011). No obstante, estas medidas no han sido suficientes para controlar la aparición de brotes en la población.

En Chile, a diferencia de los países desarrollados, no se exige que el almacenamiento, transporte y venta de huevos sea de manera refrigerada, para así, detener el crecimiento de una posible contaminación con *Salmonella* en el interior del huevo (Fica *et al.*, 2012), convirtiendo a los productos alimenticios elaborados a base de huevos en alimentos riesgosos.

En agosto del año 2011 un brote de *Salmonella* Enteritidis (SE) fue responsable de la intoxicación de 66 personas, de las cuales una falleció, por el consumo de mayonesa casera en un local de comida rápida en la comuna de Peñalolén (Sandoval, 2011). Debido a esto, en octubre del mismo año se prohibió la venta de mayonesa de elaboración artesanal, como también los aderezos que incorporen este tipo de mayonesa, mediante la modificación del Decreto N° 977 de 1996 del Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile, con el propósito de reducir el número de brotes que se presentan cada año. Sin embargo, esta medida no tendría el impacto deseado si no se acompaña de un programa educacional para la población y además de un fuerte programa de fiscalización por parte de las autoridades sanitarias en los locales de venta de alimentos (Fica *et al.*, 2012). Esto puede ser evidenciado ya que en el año 2012 la prensa informó casos de intoxicación causados por el consumo de mayonesa casera, como fueron los ocurridos a 221 personas en Limache (Anón, 2012) o a 15 personas en Quilpué (Astudillo, 2012).

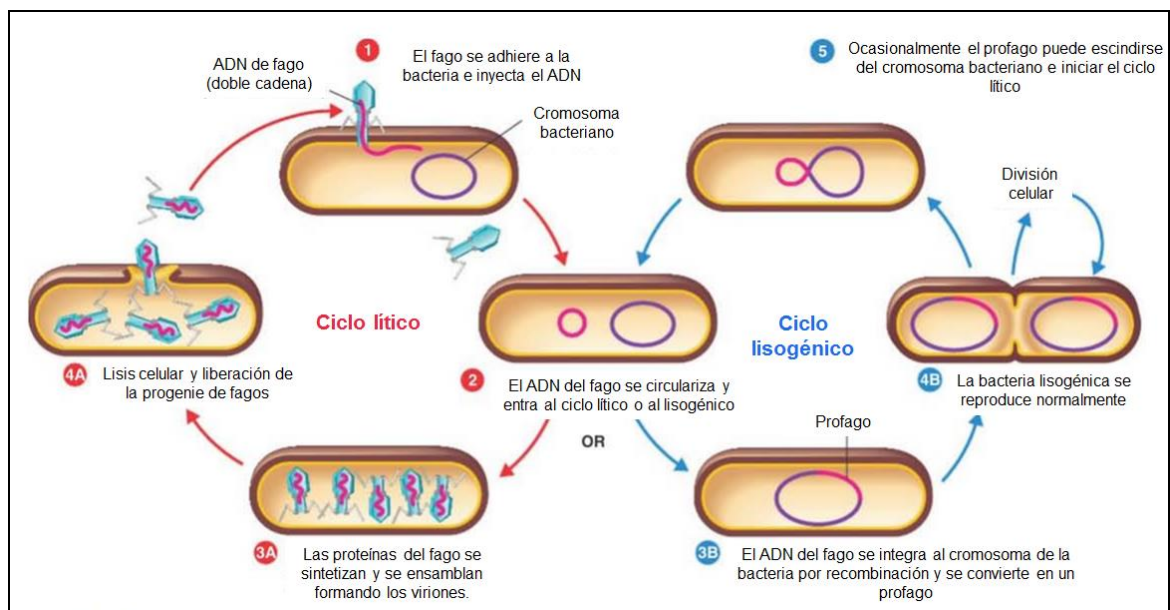
Es importante destacar que en el ámbito de la educación sanitaria de la población, generalmente los programas son de limitada penetración y duración, y los conceptos de inocuidad alimentaria no están contemplados en los contenidos curriculares de los establecimientos educacionales (Fica *et al.*, 2012).

Por lo expuesto anteriormente, el consumo de ovoproductos elaborados artesanalmente, especialmente la mayonesa, sigue siendo un riesgo para la salud pública, por lo tanto, sería importante contar con nuevas medidas complementarias a las actuales para controlar a este patógeno. Una de estas nuevas medidas sería el uso de los bacteriófagos.

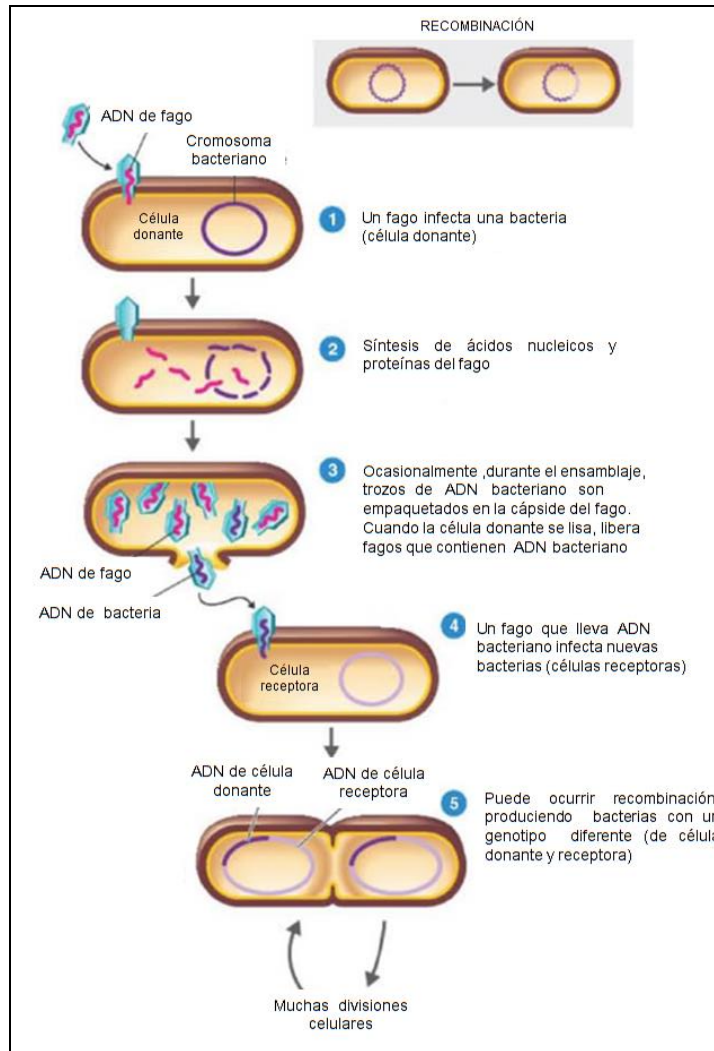
Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan exclusivamente a las bacterias. Son los organismos más antiguos y abundantes conocidos en la tierra ya que se calcula que hay alrededor de  $1 \times 10^{31}$  fagos en el planeta (Sulakvelidze, 2013). Fueron descubiertos en 1896 por Ernest Hankin. En 1915 Frederick Twort describió la actividad antibacteriana que tenían, sin embargo, fueron utilizados por primera vez como terapia antimicrobiana en 1919 por Félix d'Herelle (García *et al.*, 2008).

Según su ciclo de vida los bacteriófagos se pueden clasificar en líticos o virulentos y en lisogénicos o temperados (Figura Nro.1). Los primeros, posterior a la unión o adsorción a los receptores de la bacteria, inyectan su material genético y utilizan la maquinaria

metabólica de la bacteria, para realizar replicación, transcripción y traducción del material viral, causando la lisis de ésta y la consecuente liberación de la progenie viral. Los segundos, incorporan su material genético y replican como parte del genoma bacteriano, permaneciendo en estado de latencia como profago por varias generaciones. Cuando la célula hospedera esté bajo condiciones adversas, el profago puede reactivarse y llevar a cabo un ciclo lítico (Brovko *et al.*, 2012). Estos fagos, que tienen la capacidad de permanecer de forma latente en su hospedero, pueden portar genes que codifican para factores de virulencia (p. ej. la toxina Shiga de *Escherichia coli* enterohemorrágica), es por esta razón que no pueden ser considerados en inocuidad alimentaria ya que podrían generar patógenos más virulentos (Monk *et al.*, 2010; Tatora *et al.*, 2010). Además se debe evitar que los bacteriófagos utilizados realicen transducción (Figura Nro.2), proceso por el cual el ADN bacteriano es encapsidado por error en una partícula viral, y ésta al todavía tener la capacidad de infectar nuevas bacterias puede incorporarles nuevos genes no virales (Hagens y Loessner, 2010).



**Figura Nro. 1:** “Ciclo lítico y lisogénico de un bacteriófago” (Fuente: Tatora, *et al.*, 2010, traducido por: K. Yévenes).



**Figura Nro. 2:** “Transducción por un bacteriófago” (Fuente: Totorá, *et al.*, 2010, traducido por: K. Yévenes).

Los bacteriófagos líticos se pueden utilizar en el ámbito de la inocuidad de los alimentos a nivel de toda la cadena alimentaria. Sin embargo, hasta la fecha la literatura indica que hay mayor progreso utilizando fagos en los alimentos más que en el animal vivo, ya que los alimentos no están sometidos a la dinámica de un animal vivo, como lo es la interacción con el sistema inmune o el constante cambio micro ambiental (Goodridge y Bisha, 2011).

Las principales ventajas que poseen los bacteriófagos líticos, usados como herramienta de biocontrol en alimentos, son su especificidad, ubicuidad, inocuidad, su bajo costo, estabilidad en los alimentos y que no alteran las características organolépticas de éstos. No obstante, presentan como inconveniente que los componentes de la matriz alimentaria

pueden afectar la capacidad de los fagos de encontrar e infectar a las bacterias, necesitan de un alto número de bacterias para ejercer su efecto inicial y existe el riesgo de desarrollar resistencia bacteriana a ellos. Ésta última se puede minimizar utilizando mezclas de bacteriófagos (García *et al.*, 2008; Goodridge y Bisha, 2011).

Se han realizado diversos estudios que demuestran la efectividad de los bacteriófagos en la reducción de los recuentos de *Salmonella* en diferentes alimentos y en todos ellos hay una disminución significativa (Sulakvelidze, 2013). Pese a lo anterior, no existen estudios en mayonesa, y los estudios realizados en huevos son recientes y escasos, es así como:

Spricigo *et al.* (2013) contaminaron huevos frescos, mediante inmersión, con *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis con  $10^7$  unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL). Luego, fueron rociados con un cóctel de bacteriófagos a una concentración de  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de placas líticas por mL (UFP/mL) y se incubaron a  $25^\circ\text{C}$  durante 2 horas, para posteriormente realizar los recuentos bacterianos. Los resultados demostraron una disminución de la concentración de ambas serovariedades de *Salmonella* del orden de  $0,9 \log_{10}$  UFC/g, indicando que ésta mezcla de bacteriófagos disminuye los recuentos de *Salmonella* en huevos.

También Guenther *et al.* (2012) determinaron la capacidad del bacteriófago FO1-E2 para reducir *Salmonella* Typhimurium en yema de huevo pasteurizado. Los huevos fueron contaminados con  $10^3$  UFC/g y la concentración de fagos aplicada fue de  $3 \times 10^8$  UFP/g. Las muestras se incubaron a  $15^\circ\text{C}$  por un máximo de 6 días. Como resultado se obtuvo una disminución del orden de 2,6 unidades logarítmicas al segundo día. No obstante, posterior al segundo día la actividad lítica del bacteriófago comenzó a disminuir hasta obtener, después del quinto día, un mayor recuento bacteriano en las muestras experimentales que en las controles.

En Chile Farfán (2010) contaminó huevos libres de patógenos específicos (SPF), vía cámara de aire, con SE a una dosis de  $1,28 \times 10^1$  UFC/mL. Luego administró una mezcla de bacteriófagos líticos, mediante aspersion e inmersión, con una multiplicidad de infección (MOI = relación entre la cantidad de fagos por cada bacteria) de  $10^7$ , incubándolos a temperatura ambiente durante 5 días. Los resultados arrojaron una disminución promedio en los recuentos bacterianos del orden de 3 unidades logarítmicas durante los 5 días,



sugiriendo que la mezcla de bacteriófagos fue efectiva en la reducción de SE en el contenido del huevo.

Por otro lado, Robeson *et al.* (2014) estudiaron la estabilidad de cinco bacteriófagos líticos nativos aislados desde carne molida de bovino, salsa tártara y aguas residuales, en 10 matrices alimentarias de origen animal, tanto frescas como procesadas, las cuales fueron mantenidas durante 10 días a 4 y 18 °C. Los resultados mostraron que los cinco bacteriófagos se mantuvieron estables, sin embargo, los fagos aislados desde la carne de bovino y salsa tártara mostraron una mayor estabilidad que los procedentes de aguas residuales, los cuales disminuyeron su título en 3 a 5 unidades logarítmicas.

La mezcla de fagos caracterizada por Robeson *et al.* (2014) fue utilizada por Jorquera *et al.* (2015) quienes contaminaron carne molida de bovino con  $2,6 \times 10^5$  UFC/mL de SE y le aplicaron esta mezcla de fagos con una MOI de  $10^4$ . Las muestras fueron incubadas durante 10 días a 5 y 18 °C. Al final del periodo se obtuvieron reducciones del orden de 3,54 y 3,65  $\log_{10}$  UFC/g a temperatura de refrigeración y ambiente respectivamente.

En esta memoria se busca estudiar la efectividad de la mezcla de cinco bacteriófagos líticos caracterizados por Robeson *et al.* (2014) y Jorquera *et al.* (2015) sobre mayonesa casera contaminada con SE con el propósito de reducir la contaminación bacteriana, demostrando así, su potencial aplicabilidad como herramienta biocontroladora en este alimento de riesgo.

## **HIPÓTESIS**

El uso de una mezcla de bacteriófagos líticos logra disminuir los recuentos de *Salmonella* Enteritidis en mayonesa casera experimentalmente contaminada.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la capacidad de una mezcla de bacteriófagos líticos nativos para reducir los recuentos de *Salmonella* Enteritidis en mayonesa casera experimentalmente contaminada.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.** Determinar la disminución de los recuentos de *Salmonella* Enteritidis en mayonesa casera tratada con bacteriófagos y mantenida a temperatura ambiente durante 24 y 72 horas.
- 2.** Establecer el efecto de la disminución de la temperatura de incubación en la actividad de una mezcla de bacteriófagos líticos aplicados en mayonesa casera durante 24 y 72 horas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Cepa bacteriana**

La cepa utilizada correspondió a *Salmonella* Enteritidis de origen aviar, resistente al Ácido Nalidíxico (*nal<sup>r</sup>*) y Rifampicina (*rif<sup>r</sup>*) (seleccionada en el Laboratorio de Bacteriología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV)).

### **2. Bacteriófagos**

Para este estudio se utilizaron 5 bacteriófagos líticos aislados desde aguas residuales, salsa tártara y carne de bovino, los cuales fueron preparados en el Instituto de Biología de la PUCV. Estos fagos se seleccionaron según sus características líticas frente a la cepa bacteriana, su estabilidad en el tiempo en diversas matrices alimentarias, su tolerancia al pH, su tolerancia a temperaturas entre -20 y 25° C y su rango de hospederos<sup>1</sup>. Se utilizó una MOI de 10<sup>5</sup>.

### **3. Matriz alimentaria**

La matriz alimentaria utilizada en este estudio fue mayonesa elaborada de forma artesanal con yema y clara de huevo, aceite y sal (anexo1). Los huevos fueron de color blanco extra grande, el aceite de origen vegetal y la sal de grano fino. La marca de estos ingredientes fue confidencial y fueron adquiridos desde un supermercado de la Región Metropolitana. Los huevos tenían fecha de elaboración lo más cercana al día de adquisición (no mayor a siete días) para luego ser mantenidos en refrigeración, no más de 72 horas, hasta ser utilizados. Antes de su proceso, éstos se limpiaron con algodón con alcohol al 70%.

Paralelamente al desarrollo del experimento, la mayonesa se sometió a detección de *Salmonella* sp. por medio de bacteriología cualitativa (ver punto 4.5), para corroborar la ausencia de contaminación procedente de una cepa de campo contenida en los huevos o contaminación intralaboratorio.

---

<sup>1</sup>Robeson, James. 2014. [Comunicación personal]. Laboratorio de Bacteriología. Instituto de Biología. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Campus Curauma.

## **4. Diseño experimental**

### **4.1 Cálculo de dosis bacteriana**

Para determinar la concentración de SE que permitiera contaminar la mayonesa, logrando recuentos elevados, a temperatura ambiente (21°C) y de refrigeración (6°C), se trabajó con 10 muestras de 3mL de mayonesa. Estas fueron inoculadas con SE (ver punto 4.2) con un volumen correspondiente al 50 % del total de la muestra (1,5 mL) y se incubaron por un periodo de 24 horas, 5 de estas muestras a temperatura ambiente y 5 a temperatura de refrigeración. A las 24 y 72 horas post contaminación, se realizaron diluciones al décimo en Agua Peptonada Tamponada (APT, Difco ®) para realizar un recuento bacteriológico (ver punto 4.4). Se analizaron dosis desde  $10^2$  UFC/mL en adelante y se seleccionó aquella dosis más baja que logró recuentos  $> 10^2$  UFC/mL en su primera dilución.

### **4.2 Preparación del inóculo bacteriano**

El inóculo se elaboró desde una cepa de SE *nal<sup>r</sup> rif<sup>r</sup>* en caldo Luria Bertani (Difco ®) incubado a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas. La turbidez del cultivo fue ajustada a un valor de absorbancia entre 0,4 y 0,8 a 625 nm de longitud de onda (Spectroquant® Pharo 300-Merck®), rango equivalente a  $10^8$  UFC/mL. Desde esta preparación se realizaron diluciones al décimo en APT (Difco ®) hasta lograr la dosis definida anteriormente.

La concentración del inóculo fue corroborada mediante recuento, sembrando 100µL de las diluciones en placas de agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD, Difco ®) adicionadas con Ácido Nalidíxico (Sigma-Aldrich ®, 50µg/mL) y Rifampicina (Sigma®, 50 µg/mL) las que se incubaron a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24-48 horas.

### **4.3 Contaminación de las muestras con la cepa desafío y aplicación de la mezcla de bacteriófagos**

Se utilizaron grupos de 24 muestras individualizadas en bolsas Whirl-Park® con 25 mL de mayonesa cada una. Estas fueron contaminadas con SE *nal<sup>r</sup> rif<sup>r</sup>* con la concentración definida previamente en el punto 4.1. La contaminación de las muestras se realizó en un gabinete de bioseguridad Healforce® (HF safe 1200) utilizando un volumen aproximado al

50% del tamaño total de la muestra y luego se dejaron en reposo durante dos horas, para permitir la adaptación de SE al medio y su adhesión a la superficie de la matriz. Luego, a cada muestra contaminada se le agregó una alícuota de la mezcla de bacteriófagos, suspendidos en buffer SM modificado (50 mL Tris-HCl 1 M, pH 7,5 - 2g MgSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O) en un volumen aproximado del 10% del peso de la muestra, y utilizando una MOI de 10<sup>5</sup>. Estas muestras fueron mantenidas en cajas herméticamente cerradas durante 72 horas a temperatura ambiente (estufa a 21°C) y a temperatura de refrigeración (6°C).

Para cada grupo experimental se estableció un grupo control de 24 muestras contaminadas sólo con SE a las cuales se les adicionó como placebo un buffer SM modificado, de las mismas características a las que incorpora a los fagos, en un volumen aproximado del 10% del peso de la muestra. Los grupos control y experimental fueron mantenidos y procesados en dos laboratorios diferentes para prevenir toda posibilidad de contaminación cruzada y a ambos grupos se les realizó bacteriología cuantitativa a las 24 y 72 horas post inoculación. Además, se dispuso de dos grupos blancos de 5 muestras que no fueron contaminadas con SE ni tratadas con bacteriófagos, las que fueron mantenidas junto a las muestras experimentales y sometidas a una bacteriología cualitativa al finalizar el estudio, con el objetivo de descartar una posible contaminación intralaboratorio de SE.

#### **4.4 Bacteriología cuantitativa (recuento de SE)**

A las 24 horas de incubación se adicionaron 225 mL de APT (Difco ®) a las muestras y se homogeneizaron durante 1 minuto en un equipo triturador homogeneizador (Stomacher 400® circulator). Luego se realizaron diluciones al décimo en APT (Difco ®) y posteriormente se sembraron 100 µL de las diluciones en placas de agar XLD (Difco®), adicionadas con Rifampicina (Sigma®, 50 µg/mL) y Ácido Nalidíxico (Sigma®, 50 µg/mL). Todas las placas se sembraron, en duplicado, en superficie con un asa de Digrafsky e incubaron a 37°± 1°C durante 24-48 horas. La lectura se realizó sólo a las placas que presentaron un número ≤ a 150 colonias y a las muestras negativas al recuento se les realizó bacteriología cualitativa. Este procedimiento se repitió con todas las muestras a las 72 horas de incubación, tanto a temperatura ambiente como de refrigeración.

#### **4.5 Bacteriología cualitativa (detección de SE)**

Para la detección de SE se utilizó como referencia la Norma ISO 6579: 2002 “Microbiology of food and animal feeding stuff- horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.” (ISO 6579, 2002), modificada por el laboratorio de microbiología en el uso de un medio líquido de enriquecimiento, un medio selectivo sólido y añadiendo antibióticos a las placas de agar. Para ello, la muestra con APT (Difco ®) se incubó a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $18 \pm 2$  horas. Luego se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  a un tubo con 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV, Difco®) y se incubaron en un baño termostático a  $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \pm 3$  horas. Posteriormente fueron sembradas en placas con agar XLD (Difco®), adicionadas con Rifampicina y Ácido Nalidíxico, e incubadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 3$  horas.

#### **5. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en la bacteriología cuantitativa fueron expresados en unidades logarítmicas y las diferencias entre las medias, de las muestras tratadas versus las no tratadas con fagos, fueron analizadas mediante un Análisis de Varianza. Las muestras negativas a la bacteriología cuantitativa fueron consideradas como valores faltantes.

Los datos fueron analizados con el programa InfoStat® 2008 (Di Rienzo *et al.*, 2008).

#### **6. Normas de bioseguridad**

Se contemplaron las normas referentes a un nivel 2 de bioseguridad, correspondientes a salmonelas no tíficas (CONICYT, 2008).

## **RESULTADOS**

### **1. Cálculo de dosis bacteriana**

Se determinó que las concentraciones del inóculo bacteriano de SE aplicado a las muestras mantenidas a temperatura ambiente y de refrigeración estuvieran entre un rango de  $1-9 \times 10^3$  y  $1-9 \times 10^4$  UFC/mL respectivamente.

### **2. Bacteriología cualitativa: mayonesa casera**

La bacteriología cualitativa realizada a la mayonesa, previo a contaminarla con la bacteria y adicionarle los fagos, fue negativa al crecimiento de SE lo cual descartó la existencia de contaminación procedente de una cepa de campo contenida en los huevos comerciales o contaminación intralaboratorio.

### **3. Análisis de varianza**

Debido a que en la contaminación inicial se utilizó un inóculo bacteriano diferente para las muestras a temperatura ambiente y de refrigeración, esta variable no fue considerada dentro del modelo de análisis. Sin embargo, se realizaron dos análisis de varianza (ANDEVA) independientes para cada condición de temperatura de acuerdo a lo detallado a continuación.

Inicialmente, se utilizó un modelo con dos factores, incorporando las variables independientes fago (con dos niveles, con y sin fagos) y tiempo (con dos niveles, 24 y 72 horas). En base a este análisis se determinó que el factor tiempo no fue influyente de forma significativa sobre la variable dependiente recuento bacteriano, por lo tanto, fue excluido de análisis posteriores.

En consideración a lo señalado anteriormente, en el ANDEVA definitivo se ajustó un modelo unifactorial el cual fue especificado de la siguiente forma:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:  $Y_{ij}$ : Observación del tratamiento  $i$  en el recuento bacteriano  $j$   
 $\mu$  : Media poblacional  
 $\alpha_i$  : Efecto del tratamiento  $i$   
 $\epsilon_{ij}$  : Error aleatorio asociado a la observación  $Y_{ij}$

Este modelo fue aplicado, de manera independiente, a las muestras mantenidas a temperatura ambiente y de refrigeración.

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de los ANDEVA realizados fluctuó entre un rango de 0,96 y 0,99, indicando que más de un 95% de la variabilidad total de la variable recuento bacteriano fue explicada por el modelo ajustado en cada caso, en consecuencia, por el tratamiento con bacteriófagos.

#### 4. Bacteriología cuantitativa: mayonesa casera mantenida a temperatura ambiente

Los recuentos promedio de SE de los diferentes grupos se pueden observar en la tabla Nro.1.

El crecimiento de la cepa bacteriana fue observado en todas las muestras controles, aumentando 2,75 unidades logarítmicas de SE/mL a las 24 horas y 6,26 unidades logarítmicas de SE/mL a las 72 horas.

**Tabla Nro. 1.** Recuentos promedio de *Salmonella* Enteritidis en mayonesa casera, con y sin tratamiento de fagos, almacenada a temperatura ambiente<sup>1</sup>, según tiempo de incubación.

Tiempo (horas)	Tratamiento con Fagos <sup>2</sup>	Dosis inicial ( $\log_{10}$ UFC/mL)	Recuentos promedio ( $\log_{10}$ UFC/mL) $\pm$ DE <sup>3</sup>	Recuentos Min-Max de SE ( $\log_{10}$ UFC/mL)
24	-	2,62	5,37 <sup>a</sup> $\pm$ 0,2	5,06 - 5,66
	+		3,23 <sup>b</sup> $\pm$ 0,3	2,70 - 3,64
72	-	2,98	9,24 <sup>a</sup> $\pm$ 0,2	8,95 - 9,83
	+		6,24 <sup>b</sup> $\pm$ 0,4	6,00 - 7,04

<sup>1</sup> : Temperatura ambiente  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

<sup>2</sup> : -, Grupo control (sin tratamiento) de 24 muestras; +, Grupo experimental (tratado con bacteriófagos) de 24 muestras.

<sup>3</sup> : DE: Deviación Estándar.

<sup>a,b</sup>: Letras diferentes señalan que hay diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,0001$ ).



Al comparar los recuentos promedios de SE del grupo control, versus su respectivo grupo experimental, es posible indicar que hubo una reducción promedio de 2,14 unidades logarítmicas de SE/mL a las 24 horas y de 3 unidades logarítmicas de SE/mL a las 72 horas. Ambas reducciones fueron estadísticamente significativas ( $p \leq 0,0001$ ).

El recuento promedio del grupo experimental a las 72 horas se realizó solamente con 12 muestras ya que las 12 restantes se encontraban negativas a la bacteriología cuantitativa, siendo consideradas como valores faltantes.

### 5. Bacteriología cuantitativa: mayonesa casera mantenida a temperatura de refrigeración

Los recuentos promedio de SE de los diferentes grupos pueden ser observados en la tabla Nro. 2.

El desarrollo de la cepa bacteriana fue evidenciado en todas las muestras controles, aumentando 1,24 unidades logarítmicas de SE/mL a las 24 horas y 1,17 unidades logarítmicas de SE/mL a las 72 horas.

**Tabla Nro. 2.** Recuentos promedio de *Salmonella* Enteritidis en mayonesa casera, con y sin tratamiento de fagos, almacenada a temperatura de refrigeración<sup>1</sup>, según tiempo de incubación.

Tiempo (horas)	Tratamiento con Fagos <sup>2</sup>	Dosis inicial ( $\log_{10}$ UFC/mL)	Recuentos promedio ( $\log_{10}$ UFC/mL) $\pm$ DE <sup>3</sup>	Recuentos Min-Max de SE ( $\log_{10}$ UFC/mL)
24	-	4,02	5,26 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	5,11 - 5,42
	+		2,29 <sup>b</sup> $\pm$ 0,2	1,90 - 2,75
72	-		5,19 <sup>a</sup> $\pm$ 0,2	4,79 - 5,38
	+		2,37 <sup>b</sup> $\pm$ 0,3	1,70 - 2,78

<sup>1</sup> : Temperatura de refrigeración  $6^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

<sup>2</sup> : -, Grupo control (sin tratamiento) de 24 muestras ; +, Grupo experimental (tratado con bacteriófagos) de 24 muestras.

<sup>3</sup> : DE: Deviación Estándar.

<sup>a,b</sup>: Letras diferentes señalan que hay diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,0001$ ).

Las diferencias entre los recuentos de SE del grupo experimental y su respectivo grupo control a las 24 horas fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ), logrando reducciones del orden de 2,97 unidades logarítmicas de SE/mL. Por otro lado, las

diferencias entre los recuentos de SE del grupo experimental y su respectivo control a las 72 horas también fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ), obteniéndose reducciones del orden de 2,82 unidades logarítmicas de SE/mL.

En cuanto a las muestras de los grupos blancos utilizadas en toda la experiencia, estas fueron negativas al crecimiento de SE, lo cual descartó una contaminación intralaboratorio.

## DISCUSIÓN

Al ser la primera vez que se realiza un estudio de aplicación de bacteriófagos líticos en mayonesa casera como herramienta de biocontrol, las dosis de SE utilizadas para contaminar las muestras a diferentes temperaturas tuvieron que ser calculadas debido a la ausencia de concentraciones referenciales. Los valores que se eligieron en ambas temperaturas debieron cumplir con dos requisitos, el primero es que debían proporcionar muestras con recuentos factibles de contar (hasta 150 colonias por placa) y el segundo es que debían otorgar una concentración bacteriana inicial base suficientemente alta que permitiera tener una óptima acción lítica de la mezcla de bacteriófagos. Los valores que fueron elegidos se encuentran dentro de los rangos que se utilizaron en otros estudios similares, tales como Guenther *et al.* (2012) que contaminaron muestras de yema de huevo pasteurizada, leche chocolatada y mariscos, entre otros, utilizando concentraciones de  $10^3$  UFC/g u mL de *Salmonella* Typhimurium, Jorquera *et al.* (2015) que contaminaron carne molida de bovino con  $10^5$  UFC/mL de *Salmonella* Enteritidis y Kang *et al.* (2013) que contaminaron muestras de piel de pollo con  $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> de SE.

La mezcla de estos cinco bacteriófagos líticos fue exitosa y redujo de manera significativa los recuentos de SE en mayonesa casera mantenida durante 24 y 72 horas a temperatura ambiente y de refrigeración. Las reducciones de 2,14 log<sub>10</sub> UFC/mL a las 24 horas y de 3 log<sub>10</sub> UFC/mL a las 72 horas, logradas a temperatura ambiente, son bastante favorables si se comparan con matrices alimentarias particularmente relacionadas a la mayonesa, como son los huevos. Es así como, Guenther *et al.* (2012) contaminaron yema de huevo pasteurizada con  $10^3$  UFC/g de *Salmonella* Thyphimurium para luego adicionar el fago FO1-E2 a  $3 \times 10^8$  UFP/g y dejarlas a 15°C por un máximo de 6 días, obteniendo una disminución de 2,6 log<sub>10</sub> UFC/g, sin embargo, esto solo ocurrió hasta el segundo día, posterior a esto la actividad de los fagos comenzó a disminuir y al quinto día las muestras experimentales contenían un mayor número de bacterias que las muestras controles. Los autores indicaron que esta situación podría deberse a la distribución no homogénea y limitada difusión del fago en una matriz altamente viscosa como lo es la yema de huevo. Resultados similares obtuvo Farfán (2010) en huevos libres de patógenos específicos, en donde al contaminar con  $1,28 \times 10^1$  UFC/mL de SE y adicionar una mezcla de tres

bacteriófagos a  $10^8$  UFP/mL, para luego ser incubadas a 25°C durante 5 días, obtuvo aproximadamente 3 unidades logarítmicas de reducción, independiente de las vías de administración (aspersión e inmersión) y el tiempo (2 a 5 días). Diferente fue para Spricigo *et al.* (2013) quienes trabajaron en variadas matrices alimentarias, incluyendo huevos frescos, los cuales fueron sumergidos en una suspensión de  $10^7$  UFC/mL de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* y rociados con un coctel de fagos a una concentración de  $10^{10}$  UFP/mL, luego se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las reducciones de solamente  $0,9 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> no fueron tan altas como en las otras matrices, señalando los autores, que este resultado se pudo ver influenciado porque probablemente no se consiguió una contaminación homogénea de *Salmonella* en la superficie del huevo y además podría haber translocación de microorganismos desde la superficie de la cáscara a su membrana externa e interna, lo que afectaría el efecto de los fagos. Es impracticable comparar los resultados de este último autor con este estudio, ya que los recuentos se realizaron apenas a las 2 horas de incubación, no obstante, otros estudios indican que, en términos generales, a mayor tiempo de incubación existe un mayor efecto de los bacteriófagos sobre la inactivación bacteriana (Bigwood *et al.*, 2008; Galarce *et al.*, 2014; Jorquera *et al.*, 2015), por lo tanto, es posible pensar que la reducción de recuentos bacterianos del estudio de Spricigo *et al.* (2013) fuera mayor a las 24 o 72 horas.

El reglamento sanitario de los alimentos define a la mayonesa como una emulsión de aceite comestible en huevo, adicionada de sal, ácidos orgánicos, condimentos y aditivos, la cual está clasificada dentro de las salsas (Chile, 2013). Por lo tanto, esta matriz alimentaria se enmarca dentro de los alimentos de consistencia líquida o semilíquida. Diferentes autores hacen hincapié en que uno de los tantos factores que influyen en la capacidad de reducción de los bacteriófagos es el tipo de matriz alimentaria. Es así como los alimentos de estructura sólida son los más difíciles de tratar ya que limitan físicamente la distribución de los fagos y además, las bacterias se pueden introducir en la matriz alimentaria, protegiéndose y volviéndose inaccesibles a éstos. A diferencia de lo que ocurre en una matriz líquida, en donde los fagos pueden difundir casi libremente y colisionar fácilmente con las bacterias (Guenther *et al.*, 2009; Hagens y Loessner, 2010).

Si se comparan los presentes resultados con los de matrices alimentarias más líquidas, estos podrían haber sido aún más prometedores. Un ejemplo es el estudio realizado en leche chocolatada por Guenther *et al.* (2012), en donde contaminaron muestras con  $10^3$  UFC/mL de *Salmonella* Typhimurium y adicionaron  $10^8$  UFP/mL de fagos, para luego ser incubadas durante 6 días a  $15^\circ\text{C}$ , arrojando una reducción de más de 5 unidades logarítmicas posterior al quinto día. En otro estudio de Guenther *et al.* (2009) en donde se analizó el uso de bacteriófagos contra *Listeria monocytogenes* en leche chocolatada mantenida a  $20^\circ\text{C}$  durante 6 días se lograron reducciones tan elevadas como 6,4 unidades logarítmicas.

Bajo los antecedentes entregados anteriormente, se puede decir que, a temperatura ambiente, esta matriz alimentaria se comportó más bien como una matriz sólida, asemejándose a los resultados obtenidos por otros autores que trabajaron contra SE y a esa misma temperatura, tales como, Galarce *et al.* (2014) quienes lograron reducciones de  $3,19 \log_{10}$  UFC/g en salmón fresco, Jorquera *et al.* (2015) quienes redujeron  $3,65 \log_{10}$  UFC/g en carne fresca de bovino y Aguirre (2013) quien logró disminuciones de  $2,56 \log_{10}$  en carne fresca de cerdo. Como todos los autores mencionados anteriormente trabajaron con la misma mezcla de bacteriófagos utilizada en este estudio, los resultados obtenidos, se pueden atribuir, en un alto porcentaje a factores propios de la matriz alimentaria, como por ejemplo su viscosidad, contenido de grasa, proteínas y carbohidratos.

En relación a los resultados obtenidos a temperatura de refrigeración, no existen parámetros de comparación con matrices vinculadas a la mayonesa, ya que los estudios publicados en huevos solamente se han realizado a temperatura ambiente. No obstante, las reducciones de  $2,97 \log_{10}$  UFC/mL logradas a las 24 horas son muy alentadoras si se comparan con las de Guenther *et al.* (2012) en una matriz líquida como lo es la leche chocolatada, en donde obtuvieron reducciones de  $3 \log_{10}$  UFC/mL al primer día de incubación a  $6^\circ\text{C}$ .

Las reducciones alcanzadas a temperatura de refrigeración fueron mayores, a las 24 horas, y semejantes, a las 72 horas, a las obtenidas a temperatura ambiente. Situación similar se ha descrito en otros estudios. Es así como, Jorquera *et al.* (2015) contaminaron muestras de carne fresca de pollo y de bovino con SE, para luego aplicarles una mezcla de bacteriófagos con una MOI de  $10^4$  y almacenarlas a  $5$  y  $18^\circ\text{C}$  durante 10 días. Por una parte, las reducciones logradas a temperatura ambiente y de refrigeración en carne de pollo fueron de

0,88 log<sub>10</sub> UFC/g y 1,66 log<sub>10</sub> UFC/g respectivamente, por otra parte, las reducciones obtenidas en carne de bovino fueron de 3,54 log<sub>10</sub> UFC/g a los 5°C y de 3,65 log<sub>10</sub> UFC/g a los 18°C. También Guenther *et al.* (2012) contaminaron una mezcla de mariscos con *Salmonella* Typhimurium y emplearon un cóctel de fagos a una MOI de 10<sup>5</sup>, luego las incubaron a temperatura ambiente y de refrigeración durante 6 días logrando reducciones, al primer día de incubación, de 2 log<sub>10</sub> UFC/g y 3 log<sub>10</sub> UFC/g respectivamente.

La efectividad del bacteriófago se puede ver influenciada por la capacidad de replicación que tiene la bacteria en el ambiente en el cual se encuentra. Es por esto que, a temperatura ambiente, los bacteriófagos pueden realizar su ciclo infectivo y producir progenie viral debido a que la maquinaria metabólica de la bacteria se encuentra activa. Esta lisis es conocida como lisis desde adentro (*lisis from with in*). Diferente es a temperatura de refrigeración, en donde la temperatura impide la finalización del ciclo lítico, por lo tanto, la lisis de la bacteria acontece debido a que un número suficientemente elevado de fagos se adhiere a la superficie bacteriana, desestabilizando su estructura y lisándola, sin aumento en el número de fagos. Esta lisis es conocida como lisis desde afuera (*lisis from with out*) (Hagens y Loessner, 2010; Abedon, 2011; Ferguson *et al.*, 2013). En el caso particular de *Salmonella* spp. , generalmente no se espera crecimiento a temperaturas menores a 6°C (Pui *et al.*, 2011).

En el presente estudio, se observó que SE creció a temperatura de refrigeración, aumentando 1,24 log<sub>10</sub> UFC/mL a las 24 horas de incubación, a diferencia de lo ocurrido en estudios similares realizados con esta misma mezcla de fagos pero, en carnes frescas de cerdo y salmón (Aguirre, 2013; Galarce *et al.*, 2014). Por lo tanto, es posible pensar que la semejanza de los resultados obtenidos a temperatura ambiente y de refrigeración podría deberse, contrario a lo que señala la literatura, al crecimiento que logró SE a 6°C, en donde la maquinaria metabólica de algunas bacterias estaría activa y un porcentaje de los bacteriófagos lograría realizar lisis desde adentro. Si se quisiera corroborar la existencia de este tipo de lisis, lo ideal sería medir la titulación de los bacteriófagos en las muestras de mayonesa, actividad que no se realizó en el presente estudio.

Los factores que pudieron contribuir a que la bacteria creciera a temperatura de refrigeración en mayonesa podrían ser explicados debido a una respuesta de adaptación

frente al choque de frío, la cual permite que, posterior al cese del crecimiento, exista una reanudación de éste (Wesche *et al.*, 2009). Se ha demostrado que SE puede crecer en el interior del huevo a 6°C, aumentando más de una unidad logarítmica de SE/mL a las dos semanas de incubación (Lublin y Sela, 2008). Esta capacidad, en conjunto con el corto periodo de incubación al cual fueron sometidas las muestras, el pH de la matriz que fluctuó entre 6 y 7, y las características altamente nutritivas que entrega la mayonesa a la bacteria, pudieron ser determinantes para generar el ambiente que permitió el crecimiento de SE en la matriz alimentaria mantenida a 6°C. Además, no se puede descartar la posibilidad de que la temperatura del refrigerador haya presentado variaciones nocturnas que no fueron monitoreadas y con ello, permitir el crecimiento de la bacteria.

A pesar de que la estabilidad de estos bacteriófagos está demostrada en diferentes matrices, tales como, carne de bovino, salmón, cerdo, pollo, pavo y queso de cabra, entre otros (Robeson *et al.*, 2014), aún no se ha determinado la estabilidad en un producto ya elaborado como lo es la mayonesa, de esta forma, no se puede descartar la influencia de este factor en los resultados obtenidos. El único estudio al respecto es el de Robeson *et al.* (2011) quienes establecieron una buena estabilidad de otro bacteriófago en yema y albúmina de huevo, indicando que fue estable durante 144 horas a 25°C.

Si bien la reducción de los recuentos alcanzados en este estudio utilizando una MOI de  $10^5$  son satisfactorias y semejantes a las de otras publicaciones, tal como, Guenther *et al.* (2012). Algunos autores indican que obtuvieron una mayor inactivación bacteriana cuando administraron los fagos en mayores concentraciones, es así como, Guenther *et al.* (2009) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de fagos sobre *Listeria monocytogenes* en matrices alimentarias tanto líquidas como sólidas, incubadas a 6°C durante 6 días. En este estudio observaron que, en leche chocolatada, se lograron reducciones de 1 y 4,4 unidades logarítmicas utilizando una MOI de  $10^3$  y  $10^4$  respectivamente, en contraposición, a una MOI de  $10^5$  la cual logró controlar completamente al patógeno. De la misma forma, Bigwood *et al.* (2008) evaluaron la actividad de un bacteriófago en la disminución de *Salmonella* Typhimurium en carne de bovino con una MOI de  $10^1$  y  $10^4$ , señalando que las mayores reducciones bacterianas se consiguieron con la MOI más alta. Es por esto factible

postular que, si se deseara obtener mejores resultados sería recomendable aumentar la concentración de fagos, en consecuencia, la MOI.

Es importante señalar que en 12 de las muestras tratadas con fagos y sometidas a temperatura ambiente durante 72 horas, el recuento de SE en las placas de agar fue negativo, razón por la cual se realizó bacteriología cualitativa, en donde se evidenció la presencia de la bacteria. Esta situación se debe a que el método utilizado no tuvo la sensibilidad suficiente para detectar, de las diluciones sembradas, las bajas cantidades de *Salmonella*, en cambio, en la bacteriología cualitativa al utilizar un medio de enriquecimiento se puede estimular el crecimiento de las bacterias y con ello, mejorar el nivel de detección. Esta situación también fue mencionada en los trabajos realizados por Guenther *et al.* (2012), Aguirre (2013) y Cruz (2013). La bacteriología cualitativa es importante de realizar ya que con ella se puede distinguir si el recuento bacteriano fue negativo debido a que los bacteriófagos lograron eliminar completamente a la bacteria o porque los recuentos bacterianos, de las diluciones sembradas, se encontraron bajo el límite de detección.

Por último, independiente de todos los factores que pudieron o no influir en los resultados obtenidos, es importante destacar que se obtuvieron reducciones significativas y considerables, tanto a las diferentes temperaturas como periodos de incubación.



## **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos permiten concluir que, bajo las condiciones de este estudio, esta mezcla de cinco bacteriófagos líticos nativos logra reducir significativamente el recuento de *Salmonella* Enteritidis en mayonesa casera, independiente de la temperatura y tiempo de incubación a la cual fue sometida. Por lo tanto, esta mezcla de fagos podría ser utilizada como un método de biocontrol en inocuidad alimentaria y, en conjunto con otras medidas, podrían disminuir la incidencia de brotes por ETA.

## BIBLIOGRAFÍA

- **ABEDON, S.** 2011. Lysis from without. *Bacteriophage*. 1(1):46-49.
- **AGUIRRE, M.** 2013. Biocontrol mediante la aplicación de una mezcla de bacteriófagos en carne fresca de cerdo contaminada con *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 22p.
- **ANÓN.** 2012. Intoxicados por salmonella en Limache suben a 221. [en línea]. Diario La Tercera. 24 julio 2012 <[http://www.latercera.com/noticia/nacional/2012/07/680-473999-9-intoxicados-por-salmonella-en-limache-suben-a-221.sht\\_ml#comentarios](http://www.latercera.com/noticia/nacional/2012/07/680-473999-9-intoxicados-por-salmonella-en-limache-suben-a-221.sht_ml#comentarios)> [consulta: 18-05-2014].
- **ASTUDILLO, D.** 2012. Mayonesa casera deja 15 personas intoxicadas en Quilpué. [en línea]. Diario La Tercera. 30 enero 2012 <<http://www.latercera.com/noticia/nacional/2012/01/680-427716-9-mayonesa-casera-deja-15-personas-intoxicadas-en-quilpue.shtml>> [consulta: 21-05-2014].
- **BIGWOOD, T.; HUDSON, J.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; HEINEMANN, J.** 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol.* 25: 400-406.
- **BROVKO, L.; ANANY, H.; GRIFFITHS, M.** 2012. Bacteriophages for detection and control of bacterial pathogens in food and food-processing environment. *Adv. Food Nutr. Res.* 67:241-288.
- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD.** 2013. Decreto supremo N° 977/96 Reglamento Sanitario de los Alimentos. Actualización 29 noviembre 2013.
- **CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA.** 2008. Manual de normas de bioseguridad. 2ª ed. Santiago, Chile. 139 p.
- **CRUZ, F.** 2013. Bacteriófagos líticos como agentes biológicos que reducen la carga de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis en carne fresca de pollo experimentalmente contaminada. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 21p.
- **DI RIENZO, J.; CASSANOVES, F.; BALZARINI, M.; GONZÁLEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.** 2008. InfoStat Software estadístico, versión 2008. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

- **FARFÁN, F.** 2010. Efecto de una mezcla de tres bacteriófagos en la reducción de *Salmonella* Enteritidis en huevos SPF experimentalmente infectados. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 69p.
- **FERGUSON, S.; ROBERTS, C.; HANDY, E.; SHARMA, M.** 2013. Lytic bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157:H7 on fresh cut lettuce introduced through cross-contamination. *Bacteriophage*. 3(1):1-7.
- **FICA, A.; ACOSTA, G.; DABANCH, J.; PERRET, C.; TORRES, M.; LÓPEZ, J.; JOFRÉ, L.; WEITZEL, T.** 2012. Brotes de salmonelosis y el tamaño y rol del Estado en Chile. *Rev. Chil. Infect.* 29(2):207-214.
- **GALARCE, N.; BRAVO, J.; ROBESON, J.; BORIE, C.** 2014. Bacteriophage cocktail reduces *Salmonella enterica* serovar Enteritidis counts in raw and smoked salmon tissues. *Rev. Argent. Microbiol.* 46(4):333-337.
- **GARCÍA, P.; MARTÍNEZ, B.; OBESO, J. M.; RODRÍGUEZ, A.** 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett. Appl. Microbiol.* 47(6):479-485.
- **GOODRIDGE, L.; BISHA, B.** 2011. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*. 1(3):130–137.
- **GUENTHER, S.; HUWYLER, D.; RICHARD, S.; LOESSNER, M.** 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:93-100.
- **GUENTHER, S.; HERZIG, O.; FIESELER, L.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M.** 2012. Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *Int. J. Food. Microbiol.* 154(1-2):66–72.
- **HAGENS, S.; LOESSNER, M.** 2010. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11(1):58-68.
- **ISO 6579. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.** 2002. Microbiology of food and animal feeding stuff- horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 4<sup>a</sup> ed. 27p.
- **JORQUERA, D.; NAVARRO, C.; ROJAS, V.; TURRA, G.; ROBESON, J.; BORIE, C.** 2015. The use of a bacteriophage cocktail as a biocontrol measure to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis contamination in ground meat and goat cheese. *Biocontrol Sci. Tech.* 25(7) 970-974.

- **KANG, H.; KIM, J.; JUNG, T.; WOO, G.** 2013. Wksl3, a new biocontrol agent for *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium in foods: characterization, application, sequence analysis, and oral acute toxicity study. *Bacteriophage*. 79(6):1956-1968.
- **LUBLIN, A.; SELA, S.** 2008. The impact of temperature during the storage of table eggs on the viability of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Virchow in the eggs. *Poultry Sci*. 87(11):2208–2214.
- **MINSAL. MINISTERIO DE SALUD DE CHILE.** 2013. Enfermedades transmitidas por los alimentos informe de situación se 1 a la se 52 del 2013. Departamento Epidemiología. [En línea] < [http://epi.minsal.cl/epi/html/\\_bolets/reportes/Entericas/Informe\\_entericas\\_SE522013.pdf](http://epi.minsal.cl/epi/html/_bolets/reportes/Entericas/Informe_entericas_SE522013.pdf) > [consulta: 15-04-2014].
- **MONK, A.; REES, C.; BARROW, P.; HAGENS, S.; HARPER, D.** 2010. Bacteriophage applications: where are we now?. *Lett. Appl. Microbiol*. 51(4):363-369.
- **PUI, C.; WONG, C.; CHAI, L.; TUNUNG, R.; JEYALETCHUMI, P.; NOOR HIDAYAH, M.; UBONG, A.; FARINAZLEEN, M.; CHEAH, Y.; SON, R.** 2011. *Salmonella*: A foodborne pathogen. *Int. Food Res. J.* 18(2):465-473.
- **ROBESON, J.; VALENCIA, M.; RETAMALES, J.; BORIE, C.** 2011. Stability inside hen eggs of a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis bacteriophage. *E. J. Biotechnol*. 14(4):11-11.
- **ROBESON, J.; TURRA, G.; HUBER, K.; BORIE, C.** 2014. A note on stability in food matrices of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis-controlling bacteriophages. *E. J. Biotechnol*. 17:189-191.
- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2011. Programa de control de *Salmonella* spp. en establecimientos comerciales de aves. **In:** III Encuentro del Programa de Reducción de Patógenos. Valdivia, Chile. 26-27 abril, 2011. Universidad Austral de Chile; Asociación de Productores Avícolas de Chile (APA). pp. 125-129.
- **SANDOVAL, G.** 2011. Minsal prohíbe mayonesa casera en restaurantes de Santiago. [en línea]. *Diario La Tercera*. 30 agosto 2011 < <http://diario.latercera.com/2011/08/30/01/contenido/pais/31-81911-9-minsal-prohibe-mayonesa-casera-en-restaurantes-de-santiago.shtml> > [consulta: 19-05- 2014].

- **SPRICIGO, D.; BARDINA, C.; CORTÉS, P.; LLAGOSTERA, M.** 2013. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *Int. J. Food Microbiol.* 165(2):169–174.
- **SULAKVELIDZE, A.** 2013. Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens. *J. Sci. Food. Agric.* 93(13):3137–3146.
- **TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C.** 2010. *Microbiology - An Introduction*. 10<sup>th</sup> ed. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, CA. 812 p.
- **WESCHE, A.; GURTNER, J.; MARKS, B.; RYSER, E.** 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 72(5):1121-1138.

## **ANEXOS**

### **1. Receta de cocina (modificada) del chef Karlos Arguiñano**

(<http://www.todareceta.cl/click/indx/2663696/?site=cookingwithkiwi.blogspot.com>)

#### **Elaboración de la mayonesa (300 g)**

##### **a. Ingredientes:**

- 2 yemas y claras de huevo
- 300 mL de aceite de maravilla
- 5 g de sal fina

##### **b. Preparación:**

- Verter en la licuadora la yema y la clara de los dos huevos.
- Encender la licuadora a primera velocidad y dejar caer un chorro muy fino del aceite.
- Cuando la mayonesa tome un poco de consistencia agregar la sal.
- Dejar licuar hasta que quede una emulsión homogénea estable, tome una consistencia semilíquida y sea fácil de untar.