

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Aislamiento de bacteriófagos líticos contra *Listeria monocytogenes*

Giuliana Andrea von Buchwald Cacao

Biología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Bióloga

Quito, 18 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

Aislamiento de bacteriófagos líticos contra *Listeria monocytogenes*

Giuliana Andrea von Buchwald Cacao

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata Mena, PhD

Quito, 18 de diciembre de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Giuliana Andrea von Buchwald Cacao

Código: 00320339

Cédula de identidad: 0925650715

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un patógeno alimentario que representa un riesgo significativo para la salud pública debido a su capacidad de sobrevivir en condiciones adversas y formar biopelículas en superficies. Debido a las biopelículas resistentes a varios tratamientos, se ha incentivado la búsqueda de fagos líticos para el control de este patógeno en cadenas de procesamiento de alimentos. Este estudio tuvo como objetivo aislar fagos líticos contra *L. monocytogenes* a partir de fuentes ambientales como aguas residuales, moscas y quesos artesanales. Se realizaron colectas entomológicas y de aguas residuales de los ríos Machángara y Esmeraldas y queso manabita artesanal. Se prepararon en total 16 cocteles con los cuales se realizó la prueba de la gota para la identificación de fagos líticos contra varias cepas de *Listeria* sp. Los resultados mostraron fagos líticos para *E. coli* en las muestras de las aguas residuales, pero no se identificaron fagos líticos para *L. monocytogenes* con ninguno de los cocteles. Estos hallazgos sugieren la necesidad de explorar otras fuentes o ajustar la metodología para aislar eficazmente fagos contra *L. monocytogenes*.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, bacteriófagos, salud pública, patógenos alimenticios

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen that represents a significant risk to public health due to its ability to survive in adverse conditions and form biofilms on surfaces. Due to biofilms resistant to various treatments, the search for lytic phages for the control of this pathogen in food processing chains has been encouraged. This study aimed to isolate lytic phages against *L. monocytogenes* from environmental sources such as wastewater, flies and artisanal cheeses. Entomological and wastewater collections were made from the Machángara and Esmeraldas rivers and artisanal Manabita cheese. A total of 16 cocktails were prepared, with which the Stop Test was performed to identify lytic phages against various strains of *Listeria* sp. The results showed lytic phages for *E. coli* in the wastewater samples, but no lytic phages for *L. monocytogenes* were identified with any of the cocktails. These findings suggest the need to explore other sources or adjust the methodology to effectively isolate phages against *L. monocytogenes*.

Key words: *Listeria monocytogenes*, bacteriophages, public health, foodborne pathogens

TABLA DE CONTENIDO

Índice de tablas	9
Introducción.....	10
<i>L. monocytogenes</i> como patógeno alimentario y su importancia.....	10
Bacteriófagos como alternativa para controlar patógenos.....	12
Métodos	14
Colecta entomológica	14
Muestras de ríos.....	14
Cepas bacterianas	15
Aislamiento de fagos a partir de moscas	16
Aislamiento de fagos a partir de aguas de ríos	17
Aislamiento de fagos a partir de un alimento	18
Identificación de presencia de fagos líticos.....	18
Resultados.....	20
Discusión	21
Conclusiones.....	24
Referencias bibliográficas	25
Anexo 1. Sitios de muestreo y carnadas utilizadas en la colecta entomológica en Bucay, guayas	34
Anexo 2. Identificación taxonómica de las moscas colectadas.	35
Anexo 3. Sitios de colecta de aguas residuales.	36
Anexo 4. Composición del Phage Growth Medium y el Phage Lysing Medium	37

Anexo 5. Composición del medio DSPB	38
Anexo 6: Sitio de colecta del queso manaba	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de cepas bacterianas usadas en el estudio.....	15
Tabla 2. Ensayos para el aislamiento de fagos a partir de las moscas.....	16

INTRODUCCIÓN

***L. monocytogenes* como patógeno alimentario y su importancia**

En los últimos años se han descrito varios brotes de *Listeria monocytogenes* a nivel mundial. En Estados Unidos para el 2024 se registraron brotes en helado “soft-serve”, productos cárnicos y avícolas listos para consumir, en queso fresco y en queso cotija (U. S. Center for Disease and Control Prevention, 2024a, 2024b, 2024c). De igual manera, se identificó un brote de *L. monocytogenes* en Canadá en productos de leche vegetal de la marca Silk (Government of Canada, 2024). *Listeria monocytogenes* es un bacilo largo Gram-positivo intracelular facultativo perteneciente al género *Listeria* (Orsi & Wiedmann, 2016). Posee 13 serotipos, de los cuales los más patógenos para los humanos son 1/2 a, 1/2 b y 4b (Pontello et al., 2012). Esta bacteria es saprófita, por lo que logra adaptarse a varios nichos ecológicos, encontrándose principalmente en el suelo, lo cual juega un rol crucial en su transmisión a plantas y animales (Lourenco et al., 2022; Vivant et al., 2013).

L. monocytogenes se encuentra tanto en alimentos crudos como procesados, aunque se asocia con mayor frecuencia con productos listos para consumir (RTE, por sus siglas en inglés), como quesos, productos lácteos, helado, ensaladas, embutidos, etc. (Jordan & McAuliffe, 2018). Es un microorganismo psicrófilo, es decir, puede prevalecer en ecosistemas con bajas temperaturas (Sidorenko & Rusakova, 2022), lo que causa que se prolifere en los alimentos RTE porque la forma de preservación de estos es comúnmente la refrigeración (Walker et al., 1990). Además, es difícil eliminar a *Listeria monocytogenes* en entornos donde se procesan alimentos, debido a que puede sobrevivir en condiciones comúnmente hostiles para otros patógenos como la desinfección, variaciones la actividad de agua, temperatura y el pH (Ferreira et al., 2014; Jordan et al., 2018).

La alta supervivencia de *L. monocytogenes* se la atribuye a la capacidad de formar biopelículas, ya que esto le permite contaminar alimentos post tratamiento térmico. Se puede adherir a varias superficies o materiales como los usados en los equipos para el procesamiento de los alimentos y persistir en forma de biopelícula durante varios años (Møretrø & Langsrud, 2004). Cuando se encuentra como una biopelícula, se observa resistencia a desinfección y limpieza, además, se ha demostrado que *L. monocytogenes* puede crear biopelículas a temperaturas de entre 4 a 12 °C en vidrio y a 4°C en varias superficies como acero inoxidable (Colagiorgi et al., 2017).

Listeria monocytogenes se ha posicionado como un patógeno de alta preocupación a nivel mundial por su capacidad de causar listeriosis. Dependiendo del serotipo y el estado del sistema inmune del paciente, la listeriosis puede causar sintomatología grave o leve (Pontello et al., 2012). La listeriosis es una infección relativamente rara, con entre 0.1 a 10 casos por cada millón de personas al año (World Health Organization, 2018). La listeriosis causa sintomatología grave en recién nacidos, inmunocomprometidos, adultos mayores y embarazadas (Slutsker et al., 2000), con un porcentaje de mortalidad del 20-30% (World Health Organization, 2018). Dentro de estos síntomas se encuentra septicemia, meningitis y encefalitis, aborto y mortinatos (Bergholz et al., 2018; Craig et al., 2019; Mejía et al., 2023). En Ecuador, los estudios sobre el impacto de *Listeria monocytogenes* son escasos, ya que la listeriosis no es una enfermedad de notificación obligatoria por el Ministerio de Salud Pública. Aun así, estudios describen su prevalencia en varios alimentos vendidos en mercados del Distrito Metropolitano de Quito: queso fresco, ajíes, cárnicos, embutidos, ensaladas, salsas y frutas (Chiluisa-Utreras et al., 2017; Espinosa Mata, 2018; Razo Sandoval, 2023).

Bacteriófagos como alternativa para controlar patógenos

Los bacteriófagos son virus que invaden a las bacterias y aprovechan su maquinaria celular para reproducirse. Son las entidades biológicas más numerosas del planeta, encontrándose en todos los ecosistemas (Sharma et al., 2017). Al necesitar la maquinaria celular de las bacterias para poder replicarse, se presenta una abundancia de bacteriófagos en lugares donde existen las bacterias que pueden infectar (Addablah et al., 2021). En la mayoría de los casos, los bacteriófagos destruyen a la bacteria infectada al causar lisis celular. Asimismo, los bacteriófagos son altamente específicos, dirigidos a una sola especie bacteriana o incluso a cepas particulares dentro de una especie (Harper et al., 2011).

La resistencia de las biopelículas a diferentes tratamientos para desinfección son una preocupación en la industria alimentaria, por lo que se ha recurrido a los bacteriófagos para su control. Los fagos son capaces de destruir a la bacteria hospedadora, lo que previene que se formen biopelículas. Asimismo, pueden penetrar las biopelículas ya existentes y eliminar su estructura (Domingo-Calap & Delgado Martínez, 2018). Uno de los mecanismos que usan los bacteriófagos para erradicar las biopelículas es que pueden codificar enzimas como endolisinas y despolimerasas para romper la barrera de defensa durante las infecciones causadas por la bacteria hospedadora (Liu et al., 2022). Varios estudios demuestran el uso de bacteriófagos para combatir la formación de biopelículas como el estudio de Doolittle y colegas (1995) donde el fago T4 contra el género *Escherichia* logró eliminar biopelículas creadas por *E. coli* (Chang et al., 2022).

Específicamente para *Listeria monocytogenes*, se han descrito más de 500 bacteriófagos para su control, los cuales han sido aislados de diversas fuentes ambientales como aguas residuales, suelos, ensilaje y entornos de procesamiento de alimentos (Klumpp & Loessner, 2013). Un ejemplo es el fago A511, el cual se aisló de aguas residuales y tiene la capacidad de infectar hasta el 95% de las cepas de *L. monocytogenes* (Pietracha & Misiewicz, 2016). Otro

ejemplo es el fago ASCF1, aislado de aguas servidas en Lima, Perú que demostró actividad lítica contra *L. monocytogenes* y otros patógenos bacterianos (Alegre Quijano, 2019).

Al relacionar a bacterias con lugares con alta contaminación, los bacteriófagos se encuentran por consecuencia en estos lugares. Las moscas, orden Diptera, se asocian a lugares donde hay una alta carga microbiana, por consecuencia, se encuentran expuestas a otros agentes microbianos relacionados con las bacterias, aunque estudios relacionados sobre la presencia de bacteriófagos presentes en moscas son limitados (Addablah et al., 2021). En Ecuador, la contaminación de ríos es una preocupación para la salubridad del agua que se provee a sus habitantes: se han registrado varios factores que inciden en la contaminación de los ríos ecuatorianos, principalmente las constantes descargas de aguas residuales (Baquerizo Cabrera et al., 2019). Acorde a Vinuesa et al (2021), los ríos que presentan una mayor contaminación bacteriana que supera la legislaciones ecuatorianas de salubridad son Zamora, Esmeraldas y Machángara. En consecuencia, esto convierte a los ríos ecuatorianos en posibles fuentes de bacteriófagos por la alta presencia de contaminación bacteriana.

Por esta razón, el objetivo de este estudio fue aislar fagos líticos contra *Listeria monocytogenes* a partir de diferentes fuentes ambientales para apoyar en el control de este patógeno altamente peligroso, proponiendo una alternativa para el control de biopelículas.

MÉTODOS

Colecta entomológica

Se realizaron ocho colectas en fincas rurales dentro de “Mundo San Rafael”, un conjunto de fincas, en Bucay, Guayas: tres en la finca J8 (J8) y cinco en una finca que poseía un establo con cuatro vacas (ES4V); los sitios de muestreo se detallan en el Anexo 1. Para los muestreos se realizaron trampas con botellones plástico de un galón utilizando como guía el protocolo de Needham & Roberts (2024). En la parte posterior de la botella se añadió la carnada (camarones en descomposición, fruta, cerveza con azúcar y jugo de naranja), detallada en el Anexo 1. Se retiró la tapa de la botella, luego se volteó la parte superior de la botella previamente cortada y se la deslizó hacia el fondo de la botella, formando un embudo. Para colgar las trampas se realizan dos agujeros con un cuchillo en la parte superior de la botella y después se pasó soga por los agujeros. Se aseguró la soga y el embudo con cinta Masking. Después del muestreo se guardaron las moscas en frascos estériles y se las almacenó en refrigeración a -4°C. Finalmente, se identificaron taxonómicamente las moscas colectadas mediante un estereomicroscopio, hasta la categoría de familia, en el laboratorio de Parasitología de la Universidad San Francisco de Quito. Los detalles se presentan en el Anexo 2.

Muestras de ríos

Se utilizaron muestras previamente colectadas de dos ríos ecuatorianos: río Machángara ubicado en el Distrito Metropolitano de Quito el 17 de agosto de 2024 (M) y de dos puntos del río Esmeraldas ubicado en Esmeraldas (E001 y E004) en septiembre del 2024; especificaciones de los sitios de colecta se encuentran en el Anexo 3.

Cepas bacterianas

Se utilizaron 12 cepas bacterianas para evaluar la capacidad lítica de los 13 cocteles preparados, las cuales se describen en la Tabla 1. Las cepas se almacenaron en tubos de medio TSA (1.5% agar y 0.2% MgSO₄) pico de flauta en refrigeración a 4°C. Se revivió cada cepa en cajas Petri con medio de cultivo TSA con la técnica de estriado y se incubaron por 24 horas a 37°C.

Tabla 1. Listado de cepas bacterianas usadas en el estudio

Especie	Cepa	Serotipo	Origen
<i>Listeria monocytogenes</i>	LIS 505	4b	Tomate
<i>Listeria monocytogenes</i>	LIS 104	1/2b	Líquido de cebolla, tomate, hierbas y limón
<i>Listeria monocytogenes</i>	LIS 244	1/2a	Ají
<i>Listeria monocytogenes</i>	LIS 291	4b	Mayonesa
<i>Listeria monocytogenes</i>	LIS 366	1/2c	Ají
<i>Listeria monocytogenes</i>	LIS 862	1/2a	Ají
<i>Listeria monocytogenes</i>	LIS helado	*N/A	helado
<i>Listeria monocytogenes</i>	LIS ATCC	4b	*N/A
<i>Listeria innocua</i>	LIS 130	*N/A	Tomate y cebolla
<i>Listeria innocua</i>	LIS 681	*N/A	Ensalada de tomate y cebolla
<i>Listeria seeligeri</i>	LIS 113	*N/A	Líquido de tomate y cebolla
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	*N/A	*N/A

*No aplica

Descripción: Cepas usadas en este estudio con su código, el serotipo de la cepa en el caso de *L. monocytogenes* y la matriz alimenticia de donde se la obtuvo.

Aislamiento de fagos a partir de moscas

A partir de la identificación taxonómica hasta la clasificación de Familia de las moscas capturadas, se procedió a hacer cuatro ensayos; detallados en la Tabla 2. Para el aislamiento de fagos se siguió el protocolo de Brown & Smith (2016). Primeramente, se prepararon los medios *Phage Growth Medium* y *Phage Lysing Medium* (Anexo 4). Para esto se tomó un aproximado de 20 individuos y se los trituró con un mortero previamente esterilizado, después se agregó a 50 mL de *Phage Growth Medium* en un frasco estéril y se incubó la solución a 37°C por 42 horas. Luego de la primera incubación, se añadió 50 mL de *Phage Lysing Medium* y se incubó por segunda vez al ensayo por 6 horas a 37°C con agitación (100 rpm). Posteriormente, se centrifugó la solución por 45 minutos en tubos de Falcon de 50 mL a 4400 rpm, se recuperó el sobrenadante y se eliminó el sedimento. Por último, se filtró el sobrenadante a través de una membrana de 0.45 µm en condiciones estériles. Se almacenaron los cuatro cocteles en frascos estériles a 4°C.

Tabla 2. Ensayos para el aislamiento de fagos a partir de las moscas

Ensayo	Individuos por familia	Individuos totales
ES4V	3 Muscidae	22
	1 Tabanidae	
	1 Tachinidae	
	17 Calliphoridae	
J8001	24 Calliphoridae	24
J8002	7 Calliphoridae	13
	6 Nemestrinidae	
J8003	22 Calliphoridae	22

Descripción: División de las moscas después de ser clasificadas taxonómicamente hasta familia para la elaboración de cuatro cocteles.

Aislamiento de fagos a partir de aguas de ríos

Para el aislamiento de fagos a partir de aguas residuales de ríos, se usó como guía el protocolo descrito por Van Twest & Kropinski (2009). En total se realizaron 10 ensayos. Inicialmente se preparó medio BHI (Brain Heart Infusion) 5X y DSPB (Decca Strenght Phage Broth) (Anexo 5). Se enriquecieron las bacterias en 5 mL de caldo de enriquecimiento (TSB o BHI) por 6 horas y se añadió el agua del río. Luego se añadió medio de enriquecimiento (BHI o DSPB) y se incubó la solución por 24 horas a 37°C. Luego, se centrifugó el coctel a 4400 rpm por 45 minutos y se filtró el sobrenadante a través de una membrana de 0.45 µm. Los cocteles filtrados fueron almacenados en frascos estériles a 4°C.

Para los dos primeros cocteles con agua del río Machángara se utilizaron seis cepas de *Listeria monocytogenes*, una cepa de *L. seeligeri* y dos cepas de *L. innocua*, 45 mL de agua sin filtrar, 10 mL de BHI 5X para el primer coctel (MSF001) y 10 mL de DSPB 50X para el segundo coctel (MSF002). Por otra parte, los primeros dos ensayos con el río Esmeraldas incluyeron las mismas cepas bacterianas, 45 mL de agua filtrada del río y 10 mL de DSPB 10X (E00145 y E00445). Los siguientes ensayos con el río Esmeraldas usaron un total de 5 mL de la cepa LIS ATCC, 45 mL del agua filtrada de los dos puntos y 10 mL de DSPB 10X.

Para el siguiente ensayo con Machángara se añadió una nueva cepa de *Listeria monocytogenes*, LIS helado. Para los últimos tres cocteles (MF002, E001ATCC, E004ATCC), se cambió la temperatura de la incubación a 30°C y solo se usó la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC. El contenido del coctel MF002 fue 45 mL de agua filtrada, 5 mL de bacteria y 10 mL de BHI 5X. Los cocteles E001ATCC y E004ATCC usaron la misma cantidad

de bacteria y 8 mL de BHI 5X, pero el agua presentó unos cambios: en E001ATCC se utilizaron 15 mL del agua filtrada y en E004ATCC 17 mL.

Aislamiento de fagos a partir de un alimento

La muestra de queso manabita fue adquirida cerca del Mercado de Cumbayá, descripción del sitio de colecta se encuentra en el Anexo 6. El proceso descrito a continuación se realizó por duplicado. En una funda hermética se pesaron 50 g del queso, se le añadió 150 mL de agua estéril, se homogenizó la solución y se dejó reposar la mezcla por 4 horas a 4°C. Luego del tiempo de refrigeración, para el ensayo Q001, se midieron 25 mL de la dilución del queso con una probeta, 35 mL de bacteria previamente enriquecida por 6 horas a 30°C en caldo BHI, correspondientes a las siete cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de alimentos y 20 mL de BHI 5X. El contenido del ensayo Q002 fueron 25 mL de la dilución del queso, 5 mL de bacteria LIS ATCC previamente enriquecida por 6 horas a 30°C en caldo BHI y 10 mL de BHI 5X. Se incubaron las soluciones a 30°C por 24 horas con agitación (100 rpm). Después se centrifugaron las soluciones en tubos Falcon estériles de 50 ml a 4500 rpm por una hora y media y se filtraron en condiciones estériles con una membrana de 0.45 µm. Los cocteles filtrados fueron almacenados en frascos estériles a 4°C.

Identificación de presencia de fagos líticos

Se realizó el Spot Test de los 16 cocteles previamente elaborados con las 12 cepas bacterianas. Primero se inocularon las bacterias en 5 mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth) y se incubaron por 18 horas. Después de la incubación se homogenizaron los tubos con un vórtex y luego se agregó 300 µl de cada cultivo bacteriano a un tubo con 5 ml de medio semisólido (0.9% agar y 0.2% MgSO₄), conservado a 55°C para evitar su solidificación. Se homogenizó con un vórtex y se vertió el semisólido en el centro de una caja Petri con medio sólido TSA (1.5% agar y 0.2% MgSO₄), realizando movimientos giratorios para que se cubra por completo

la caja. Se esperó de 3 a 4 minutos a que se solidifique el semisólido. Después de la solidificación del semisólido, se agregó 10 µl de cada uno de los 16 cocteles en posiciones previamente marcadas. Se dejó reposar la caja Petri por una hora para que las gotas se absorban por completo y se las incubó durante la noche a 37°C. Para confirmar la presencia de fagos líticos se observaron las calvas formadas por los bacteriófagos líticos presentes en los cocteles.

RESULTADOS

No se obtuvo fagos líticos para *Listeria* spp. para los 16 cocteles provenientes de diferentes muestras: aguas residuales de los ríos Machángara y Esmeraldas, moscas y queso manabita. En contraste, sí se obtuvo fagos líticos para *E. coli* ATCC 25922 de los cocteles provenientes del río Machángara.

DISCUSIÓN

No se lograron aislar fagos líticos para *Listeria monocytogenes* y otras especies. En aguas residuales probablemente porque *L. monocytogenes* no es un microorganismo dominante en las muestras de ríos que tenían elevados niveles de *E. coli* (Campaña et al., 2017). Durante el enriquecimiento de la muestra, se enriquecieron a los coliformes que acompañaban a *L. monocytogenes* y consecuentemente, como esta bacteria es una mala competidora, fue eliminada de la muestra y no se pudo aislar fagos líticos (Weis & Seeliger, 1975). Sin embargo, tampoco se aislaron fagos líticos en aguas residuales filtradas lo que descarta que *L. monocytogenes* haya tenido problemas en crecer en competencia con otros microorganismos presentes.

En este estudio fue posible aislar fagos líticos en dípteros colectados en establos, a pesar de que en 1927 ya se reportó la presencia de bacteriófagos en *Musca domestica* (Shope, 1927) y algunos estudios han investigado el microbioma de *M. domestica* recolectada en áreas rurales y urbanas. Estos análisis han identificado bacterias que, aunque no afectan el desarrollo del insecto, pueden ser patógenas para humanos y animales (Junqueira et al., 2017). Aún, así cabe recalcar que en estudios previos se ha logrado la identificación de fagos líticos a partir de moscas, aunque estos fueron para especies bacterianas relacionadas a entornos fecales como *E. coli* y *Salmonella* sp. (Ortega Hidrobo, 2024; Shope, 1927). No se logró aislar fagos a partir de una muestra de queso manabita pesa a que existen varios reportes de la presencia de bacteriófagos en quesos artesanales; sin embargo, también se conoce que los fagos menos abundantes afectan a bacterias de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Listeria* (Queiroz et al., 2022).

Por otro lado, la literatura demuestra que la mayoría de los bacteriófagos encontrados que actúan contra *Listeria monocytogenes* son temperados o lisogénicos, es decir, no causan la

lisis celular de la bacteria hospedadora (Carlton et al., 2005). Estos fagos lisogénicos pertenecen a la familia Siphoviridae y se han descrito algunos de la familia Myoviridae (Klumpp & Loessner, 2013; Loessner, 1991; Loessner et al., 2008; Loessner & Busse, 1990). Consecuentemente, una posible explicación es que los fagos presentes en las muestras fueron lisogénicos.

En este estudio se emplearon un total de ocho cepas de *Listeria monocytogenes*. Al revisar estudios previos donde se logró aislar exitosamente fagos líticos contra esta bacteria el número de cepas usadas fue mayor: Stone et al. (2020) realizaron su estudio con 15 cepas de *L. monocytogenes*; Scattolini y colegas (2021) con 21 cepas, Li et al. (2022) con 50 cepas, y Byun et al. (2022) y Elsayed y colegas (2023) con 22 cepas. Al tener en cuenta que los fagos descritos para el género *Listeria* presentan un rango estrecho de hospedadores, la cantidad de cepas pudo haber limitado su aislamiento (Carlton et al., 2005).

Otro factor que pudo haber influido en los resultados obtenidos es la presencia de profagos en las cepas bacterianas utilizadas. Un profago es el estado del ADN de un bacteriófago cuando se encuentra dentro del genoma de la bacteria hospedadora durante el ciclo lisogénico (Lima-Mendez et al., 2007). Se ha descrito la presencia de profagos crípticos o intactos en los genomas de varias especies de *Listeria*. Ejemplos de profagos descritos son el fago PSA en la cepa de *Listeria monocytogenes* ScottA y el fago A118 en la cepa WSLC 1118 (Klumpp & Loessner, 2013). Al encontrarse profagos dentro del genoma de las bacterias puede provocarse el fenómeno denominado inmunidad a la superinfección. Esto se refiere a un mecanismo en el cual un profago que reside en una célula bacteriana causa que se impida infecciones por fagos líticos, mediante la producción de proteínas que bloquean la replicación o entrada de otros fagos (Patel & Maxwell, 2023).

Aun así, es importante enfatizar que se ha logrado encontrar fagos líticos que actúen eficientemente contra cepas de *Listeria monocytogenes*, a partir de los cuales se ha logrado

elaborar dos cocteles comerciales para el manejo de biopelículas de *L. monocytogenes*: PhageGuard Listex™ y ListShield™. El coctel PhageGuard Listex™ está compuesto del fago P100, el cual fue aislado de una muestra de efluente de aguas residuales tomada de una planta lechera ubicada en el sur de Alemania (Fister et al., 2016). P100 representa a uno de los pocos fagos virulentos líticos estrictos conocidos para el género *Listeria* que presenta un rango de hospedadores amplio (Carlton et al., 2005). En cambio, el coctel ListShield™ comprende una combinación de seis fagos líticos (LIST-36, LMSP-25, LMTA-34, LMTA-57, LMTA-94 y LMTA-148), efectivos contra más de 170 cepas de *Listeria monocytogenes* y es el primer coctel aprobado por la FDA para el control de esta bacteria en productos cárnicos y avícolas listos para consumir (Endersen et al., 2014; Intralytix, 2006; Kawacka et al., 2020).

CONCLUSIONES

En conclusión, las fuentes ambientales donde se buscaron fagos líticos contra *Listeria monocytogenes* en este estudio no fueron las adecuadas. Por lo tanto, al no haber encontrado fagos líticos para ninguna de las especies de *Listeria*; *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* y *L. innocua*; se confirma que estas tres especies comparten el mismo entorno y son ambientales.

Para investigar a futuro se recomienda buscar en otras fuentes ambientales como ensilaje y aguas de desecho de industrias lácteas o plantas lecheras, ya que al muestrear aguas residuales de ríos hay un efecto de dilución y se pierde la concentración de los fagos contra *Listeria monocytogenes*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addablah, A. Y. A., Kakou-Ngazoa, S., Akpa, E. E., M'Bourou Ndombi, F., Adioumani, E., Koudou, A., Coulibaly N'Golo, D., Kouame Sina, M., Kouassi, S. K., Aoussi, S., & Dosso, M. (2021). Investigation of Phages Infecting *Escherichia coli* Strains B and C, and *Enterobacter cloacae* in Sewage and Ebrié Lagoon, Côte d'Ivoire. *PHAGE (New Rochelle, N.Y.)*, 2(3), 104-111. <https://doi.org/10.1089/phage.2020.0047>
- Alegre Quijano, A. (2019). *Aislamiento y caracterización de un bacteriófago lítico de Listeria monocytogenes* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://library.co/document/z3g8jd7y-aislamiento-caracterizacion-bacteriofago-litico-listeria-monocytogenes.html>
- Baquerizo Cabrera, M., Acuña, M., & Solis-Castro, M. (2019). Contaminación de los ríos: Caso río Guayas y sus afluentes. *Manglar*, 16(1), Article 1. <https://doi.org/10.17268/manglar.2019.009>
- Bergholz, T. M., Shah, M. K., Burall, L. S., Rakic-Martinez, M., & Datta, A. R. (2018). Genomic and phenotypic diversity of *Listeria monocytogenes* clonal complexes associated with human listeriosis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8), 3475-3485. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8852-5>
- Brown, A. E., & Smith, H. R. (2016). *Benson's Microbiological Applications: Laboratory manual in general microbiology complete version* (14.^a ed.). McGraw Hill.
- Byun, K.-H., Han, S. H., Choi, M. W., Park, S. H., & Ha, S.-D. (2022). Isolation, characterization, and application of bacteriophages to reduce and inhibit *Listeria monocytogenes* in celery and enoki mushroom. *Food Control*, 135, 108826. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108826>

- Campaña, A., Gualoto, E., & Viviana, C.-U. (2017). Evaluación físico-química y microbiológica de la calidad del agua de los ríos Machángara y Monjas de la red hídrica del distrito metropolitano de Quito. *Bionatura*, 2. <https://revistabionatura.com/2017.02.02.6.html>
- Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., de Meester, E. D., & Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43(3), 301-312. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.08.005>
- Chang, C., Yu, X., Guo, W., Guo, C., Guo, X., Li, Q., & Zhu, Y. (2022). Bacteriophage-Mediated Control of Biofilm: A Promising New Dawn for the Future. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.825828>
- Chiluisa-Utreras, V. P., Cabrera-Rodríguez, M. A., & Valladares-Torres, P. K. (2017). Detección de *Listeria* spp. Y *Listeria monocytogenes* en muestras de leche cruda y quesos artesanales respectivamente, mediante PCR en Tiempo Real. *Respuestas*, 22(2), Article 2. <https://doi.org/10.22463/0122820X.1204>
- Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P. A., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. (2017). *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. *Pathogens*, 6(3), 41. <https://doi.org/10.3390/pathogens6030041>
- Craig, A. M., Dotters-Katz, S., Kuller, J. A., & Thompson, J. L. (2019). Listeriosis in Pregnancy: A Review. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 74(6), 362. <https://doi.org/10.1097/OGX.0000000000000683>
- Domingo-Calap, P., & Delgado Martínez, J. (2018). Bacteriophages: Protagonists of a Post-Antibiotic Era. *Antibiotics*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030066>

- Doolittle, M. M., Cooney, J. J., & Caldwell, D. E. (1995). Lytic infection of *Escherichia coli* biofilms by bacteriophage T4. *Canadian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1139/m95-002>
- Elsayed, M. M., Elkenany, R. M., Zakari, A. I., & Badawy, B. M. (2023). Isolation and characterization of bacteriophages for combating multidrug-resistant *Listeria monocytogenes* from dairy cattle farms in conjugation with silver nanoparticles. *BMC Microbiology*, 23(146). <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02893-y>
- Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Phage Therapy in the Food Industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(Volume 5, 2014), 327-349. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092415>
- Espinosa Mata, E. (2018). *Detection of Listeria monocytogenes in artisanal soft cheeses from different street markets of Ecuador* [Universidad San Francisco de Quito]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/8432>
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. *Journal of Food Protection*, 77(1), 150-170. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>
- Fister, S., Fuchs, S., Stessl, B., Schoder, D., Wagner, M., & Rossmanith, P. (2016). Screening and characterisation of bacteriophage P100 insensitive *Listeria monocytogenes* isolates in Austrian dairy plants. *Food Control*, 59, 108-117. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.026>
- Government of Canada. (2024, julio 8). *Various Silk and Great Value brand plant based refrigerated beverages recalled due to Listeria monocytogenes—Recalls, advisories and safety alerts – Canada.ca*. Government of Canada, Health Canada, CFIA.

<https://recalls-rappels.canada.ca/en/alert-recall/various-silk-and-great-value-brand-plant-based-refrigerated-beverages-recalled-due>

- Harper, D., Anderson, J., & Enright, M. (2011). Phage Therapy: Delivering on the Promise. *Therapeutic Delivery*, 2(7), 935-947. <https://doi.org/10.4155/tde.11.64>
- Intralix. (2006). *ListShield™*. <https://www.intralix.com/product/1?e=ListShield>
- Jordan, K., Hunt, K., Lourenco, A., & Pennone, V. (2018). *Listeria monocytogenes* in the Food Processing Environment. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5, 106-119. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0090-1>
- Jordan, K., & McAuliffe, O. (2018). *Listeria monocytogenes* in Foods. En D. Rodríguez-Lázaro (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 86, pp. 181-213). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.006>
- Junqueira, A. C. M., Ratan, A., Acerbi, E., Drautz-Moses, D. I., Premkrishnan, B. N. V., Costea, P. I., Linz, B., Purbojati, R. W., Paulo, D. F., Gaultier, N. E., Subramanian, P., Hasan, N. A., Colwell, R. R., Bork, P., Azeredo-Espin, A. M. L., Bryant, D. A., & Schuster, S. C. (2017). The microbiomes of blowflies and houseflies as bacterial transmission reservoirs. *Scientific Reports*, 7(1), 16324. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16353-x>
- Kawacka, I., Olejnik-Schmidt, A., Schmidt, M., & Sip, A. (2020). Effectiveness of Phage-Based Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Food Products and Food Processing Environments. *Microorganisms*, 8(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111764>
- Klumpp, J., & Loessner, M. J. (2013). *Listeria* phages: Genomes, evolution, and application. *Bacteriophage*, 3(3), e26861. <https://doi.org/10.4161/bact.26861>
- Li, T., Zhao, X., Wang, X., Wang, Z., Tian, C., Shi, W., Qi, Y., Wei, H., Song, C., Xue, H., & Gou, H. (2022). Characterization and Preliminary Application of Phage Isolated From

- Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Veterinary Science*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.946814>
- Lima-Mendez, G., Toussant, A., & Laplae, R. (2007). Analysis of the phage sequence space: The benefit of structured information. *Virology*, 365(2).
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.047>
- Liu, S., Lu, H., Zhang, S., Shi, Y., & Chen, Q. (2022). Phages against Pathogenic Bacterial Biofilms and Biofilm-Based Infections: A Review. *Pharmaceutics*, 14(2).
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020427>
- Loessner, M. J. (1991). Improved procedure for bacteriophage typing of *Listeria* strains and evaluation of new phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 57.
<https://doi.org/10.1128/aem.57.3.882-884.1991>
- Loessner, M. J., & Busse, M. (1990). Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1912-1918.
<https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1912-1918.1990>
- Loessner, M. J., Estela, L. A., Zink, R., & Scherer, S. (2008). Taxonomical Classification of 20 Newly Isolated *Listeria* Bacteriophages by Electron Microscopy and Protein Analysis. *Intervirology*, 37(1), 31-35. <https://doi.org/10.1159/000150353>
- Lourenco, A., Linke, K., Wagner, M., & Stessl, B. (2022). The Saprophytic Lifestyle of *Listeria monocytogenes* and Entry Into the Food-Processing Environment. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.789801>
- Mejía, L., Espinosa-Mata, E., Freire, A. L., Zapata, S., & Gozález Candelas, F. (2023). *Listeria monocytogenes*, a silent foodborne pathogen in Ecuador. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1278860>

- Møretrø, T., & Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: Biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1(2), 107-121. <https://doi.org/10.1017/S1479050504001322>
- Needham, A., & Roberts, A. (2024). *This Easy Homemade Fly Trap Will Keep Your Home Pest-Free*. The Spruce. <https://www.thespruce.com/how-to-make-a-fly-trap-1389066>
- Orsi, R. H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5273-5287. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>
- Ortega Hidrobo, I. (2024). *Musca domestica* como potencial reservorio de bacteriófagos [Universidad San Francisco de Quito]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/13775>
- Patel, P. H., & Maxwell, K. L. (2023). Prophages provide a rich source of antiphage defense systems. *Current Opinion in Microbiology*, 73, 102321. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102321>
- Pietracha, D., & Misiewicz, A. (2016). The use of products containing a phage in food industry as a new method for *Listeria monocytogenes* elimination from food (*Listeria monocytogenes* phages in food industry)—A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(1), 1-8. <https://doi.org/10.17221/217/2015-CJFS>
- Pontello, M., Guaita, A., Sala, G., Cipolla, M., Gattuso, A., Sonnessa, M., & Gianfranceschi, M. V. (2012). *Listeria monocytogenes* serotypes in human infections (Italy, 2000-2010). *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 48(2). https://doi.org/10.4415/ANN_12_02_07
- Queiroz, L. L., Lacorte, G. A., Isidório, W. R., Landgraf, M., de Melo Franco, B. D. G., Pinto, U. M., & Hoffmann, C. (2022). High Level of Interaction between Phages and Bacteria

- in an Artisanal Raw Milk Cheese Microbial Community. *mSystems*, 8(1), e00564-22.
<https://doi.org/10.1128/msystems.00564-22>
- Razo Sandoval, J. A. (2023). *Serogrupos de Listeria monocytogenes circulantes en alimentos que se expenden en Quito* [Universidad San Francisco de Quito].
<http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/13178>
- Scattolini, S., D'Angelantonio, D., Boni, A., Mangone, I., Marcacci, M., Battistelli, N., D'Agostino, K., Pomilio, F., Camma, C., Migliorati, G., & Aprea, G. (2021). Characterization and In Vitro Efficacy against *Listeria monocytogenes* of a Newly Isolated Bacteriophage, ΦIZSAM-1. *Microorganisms*, 9(4), Article 4.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040731>
- Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2017). Bacteriophages and its applications: An overview. *Folia Microbiologica*, 62(1), 17-55. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0471-x>
- Shope, R. E. (1927). BACTERIOPHAGE ISOLATED FROM THE COMMON HOUSE FLY (MUSCA DOMESTICA). *Journal of Experimental Medicine*, 45(6), 1037-1044.
<https://doi.org/10.1084/jem.45.6.1037>
- Sidorenko, M. L., & Rusakova, D. (2022). Diversity of Psychrophilic Colonies and Their Biotechnological Potential. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya*, 58, 28-54. <https://doi.org/10.17223/19988591/58/2>
- Slutsker, L., Evans, M. C., & Schuchat, A. (2000). Listeriosis. En *Emerging Infections* 4 (pp. 83-106). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1128/9781555816971.ch7>
- Stone, E., Lhomet, A., Neve, H., Grant, I. R., Campbell, K., & McAuliffe, O. (2020). Isolation and Characterization of *Listeria monocytogenes* Phage vB_LmoH_P61, a Phage With Biocontrol Potential on Different Food Matrices. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.521645>

- U. S. Center for Disease and Control Prevention. (2024a, septiembre 12). *Listeria Outbreak Linked to Ice Cream—August 2023*. *Listeria Infection (Listeriosis)*. <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-08-23.html>
- U. S. Center for Disease and Control Prevention. (2024b, septiembre 12). *Listeria Outbreak Linked to Queso Fresco and Cotija Cheese—February 2024*. *Listeria Infection (Listeriosis)*. <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-02-24.html>
- U. S. Center for Disease and Control Prevention. (2024c, diciembre 5). *Listeria Outbreak Linked to Ready-to-Eat Meat and Poultry Products*. *Listeria Infection (Listeriosis)*. <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/meat-and-poultry-products-11-24.html>
- Van Twest, R., & Kropinski, A. M. (2009). Bacteriophage Enrichment from Water and Soil. *Bacteriophage*, 501, 15-21. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_2
- Vinueza, D., Ochoa-Herrera, V., Maurice, L., Tamayo, E., Mejía, L., Tejera, E., & Machado, A. (2021). Determining the microbial and chemical contamination in Ecuador's main rivers. *Scientific Reports*, 11(1), 17640. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96926-z>
- Vivant, A.-L., Garmyn, D., & Piveteau, P. (2013). *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00087>
- Walker, S. j., Archer, P., & Banks, J. g. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(2), 157-162. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02561.x>
- Weis, J., & Seeliger, H. P. R. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in Nature. *Applied Microbiology*, 30(1), 29-32. <https://doi.org/10.1128/am.30.1.29-32.1975>

World Health Organization. (2018). *Listeriosis*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>

**ANEXO 1. SITIOS DE MUESTREO Y CARNADAS UTILIZADAS EN LA
COLECTA ENTOMOLÓGICA EN BUCAY, GUAYAS**

Sitio de colecta	Coordenadas	Carnada usada	Código de la muestra
Finca J8	2°10'53"S 79°13'24"W	Camarones	J8001
	2°10'53"S 79°13'16"W	Cerveza con azúcar	J8002
	2°10'49"S 79°13'23"W	Camarones	J8003
Finca con establo con cuatro vacas	2°10'30.9"S 79°13'43.5"W	Camarones	ES4V001
	2°10'32.0"S 79°13'40.7"W	Camarones	ES4V002
	2°10'32.7"S 79°13'41.1"W	Guíneo fermentado	ES4V003
	2°10'32.1"S 79°13'40.3"W	Cerveza con azúcar	ES4V004
	2°10'32.6"S 79°13'39.7"W	Naranja fermentada	ES4V005

ANEXO 2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS MOSCAS COLECTADAS.

Sitio de colecta	Familia	Individuos
Finca J8	Calliphoridae	51
	Nemestrinidae	6
Finca con establo con cuatro vacas	Calliphoridae	17
	Muscidae	3
	Tabanidae	1
	Tachinidae	1

ANEXO 3. SITIOS DE COLECTA DE AGUAS RESIDUALES.

Ubicación	Coordenadas	Código de la muestra
Río Esmeraldas	0°55'19.2"N 79°39'46.7"W	E001
	0°57'31.0"N 79°39'01.9"W	E004
Río Machángara	0°15'03.6"S 78°31'28.2"W	M1708

ANEXO 4. COMPOSICIÓN DEL PHAGE GROWTH MEDIUM Y EL PHAGE LYSING MEDIUM

Phage Growth Medium	
Reactivo	Cantidad
KH_2PO_4	1.5 g/L
Na_2HPO_4	3.0 g/L
NH_4Cl	1.0 g/L
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g/L
Peptona	0.01 g/L
Glicerol	10 g/L
Caseína hidrolizada	5 g/L
Gelatina	0.02 g/L
Tween-80	0.2 g/L
Phage Lysing Medium	
Phage Growth Medium	1 L
NaCN	1.0 g/L

ANEXO 5. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DSPB

Deca Strenght Phage Broth	
Peptona	100 g
Extracto de levadura	50 g
NaCl	25 g
K ₂ HPO ₄	80 g
dH ₂ O	1 L

ANEXO 6: SITIO DE COLECTA DEL QUESO MANABA

Ubicación	Coordenadas	Código de la muestra
Cumbayá	0°12'5"S 78°25'59"W	Q