



Universidad de Oviedo

Universidá d'Uviéu

University of Oviedo

Programa de Doctorado en Ingeniería Química, Ambiental y Bioalimentaria

Optimización de procesos para la producción industrial de bacteriófagos

Eva González Menéndez

Tesis Doctoral

2020

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el
Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC)





Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Programa de Doctorado en Ingeniería Química, Ambiental y Bioalimentaria

Optimización de procesos para la producción industrial de bacteriófagos

Eva González Menéndez

Tesis Doctoral

2020

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el
Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC)





RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Optimización de procesos para la producción industrial de bacteriófagos	Inglés: Improvement of large-scale bacteriophage production
2.- Autor	
Nombre: Eva González Menéndez	DNI/Pasaporte/NIE: ~
Programa de Doctorado: Programa de Doctorado en Ingeniería Química, Ambiental y Bioalimentaria	
Órgano responsable: Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente	

RESUMEN (en español)

Las propiedades antimicrobianas de los bacteriófagos los convierten en una alternativa prometedora a los antibióticos y desinfectantes, en aplicaciones como la terapia fágica o el biocontrol y desinfección de alimentos. Tales aplicaciones requieren el desarrollo de estrategias que aseguren su producción a gran escala, la viabilidad de las partículas fágicas durante los procesos de formulación, y su estabilidad durante el almacenamiento y distribución. En este contexto se han establecido los diferentes objetivos de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, se han definido las condiciones que maximizan la producción del bacteriófago estafilocócico virulento y polivalente vB_SauM-philPLA-RODI mediante la aplicación de la Metodología de la Superficie de Respuesta (MSR) infectando una cepa de grado alimentario, *S. xylosus* CTC1642. Se estudió el efecto de cuatro variables (concentración bacteriana y fágica inicial, temperatura y agitación), sobre el rendimiento del fago (respuesta), siendo la temperatura y la concentración inicial bacteriana, las variables con una influencia significativa en el proceso. El rendimiento máximo experimental de fago obtenido fue de $9,3 \log_{10}$ UFP/ml, mientras que el previsto por el modelo en las condiciones optimizadas era de $9,25 \pm 0,30 \log_{10}$ UFP/ml. Este rendimiento es comparable al obtenido con el hospedador original *S. aureus* IPLA1. Además, se comprobó que el fago philPLA-RODI mostraba el mismo rango de hospedador y una capacidad de eliminación de biopelículas muy similar, independientemente de la especie de estafilococo utilizada para su propagación.

Por otro lado, se estudió la viabilidad y estabilidad de cuatro fagos pertenecientes a dos familias: *Siphoviridae* (vB_SauS-philPLA35, vB_SauSphi-IPLA88) y *Myoviridae* (vB_SauM-philPLA-RODI y vB_SepM-philPLAC1C), bajo cinco condiciones de formulación y almacenamiento: refrigeración, congelación (-20°C, -80°C, -196°C), liofilización, secado por pulverización, con la utilización de varios agentes conservantes (disacáridos, glicerol, sorbitol y leche descremada) y encapsulación con alginato. Se observó que a bajas temperaturas (-80°C y -196°C), todos los lisados de fagos mostraron una buena viabilidad tras 24 meses congelados, independientemente del crioprotector utilizado. En el caso de la liofilización y el secado por pulverización, las principales pérdidas de viabilidad se produjeron durante el proceso de secado, siendo estables durante su almacenamiento tras 12-24 meses a 4°C. La leche descremada proporcionó una buena protección en la liofilización de los cuatro fagos y en el secado por pulverización de dos fagos (philPLA-RODI y philPLA88). La trehalosa mostró también buenas propiedades durante el secado por pulverización y permitió el almacenamiento del fago philPLA88 a 20°C durante al menos 12 meses. El fago philPLA-RODI encapsulado en alginato retuvo una alta viabilidad cuando se almacenó a 4°C durante 6 meses y a 20°C durante 1 mes. Estos resultados sugieren que la encapsulación podría ser una forma adecuada para el transporte de fagos.

Otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue el diseño de formulaciones adecuadas para mejorar la estabilidad del fago philPLA-RODI frente a factores como temperatura, pH, y presencia de sales. Para ello, se ensayaron tres tipos de vesículas (niosomas, liposomas y transferosomas), las cuales permitieron una encapsulación exitosa del fago philPLA-RODI (eficiencia de encapsulación entre 62%-98%), independientemente de la concentración de los



componentes de las vesículas. Además, la infectividad del fago encapsulado se mantuvo durante 6 meses a 4°C para los tres tipos de vesículas, con la excepción de los liposomas que contenían una baja concentración de pronanosome Lipo-N™ (30 mg/ml). A altas concentraciones de sal, el fago no se vio afectado, pero las vesículas se desestabilizaron totalmente. Los niosomas presentaron resultados más interesantes al proteger parcialmente a las partículas de fago frente a pHs bajos y temperaturas elevadas.

Por último, se estudió la existencia de interacciones sinérgicas o antagónicas entre el fago philPLA-RODI y varios desinfectantes (cloruro de benzalconio, triclosán, clorhexidina y peróxido de hidrógeno) utilizados en entornos clínicos e industriales. Se comprobó la posible interferencia en la eficacia de los mismos para eliminar bacterias patógenas, al utilizar los desinfectantes y el fago de forma combinada. Nuestros resultados sugieren que el cloruro de benzalconio sería el desinfectante más adecuado para usar en ambientes donde se apliquen fagos, ya que la mezcla de ambos antimicrobianos no provoca una disminución de la eficacia de ninguno de ellos.

RESUMEN (en Inglés)

The antimicrobial properties of bacteriophages make them a promising alternative to antibiotics and disinfectants in applications such as phage therapy or biocontrol and food disinfection. Such applications require the development of strategies to ensure large-scale production, the viability of phage particles during formulation processes and their stability during storage, as well as their distribution. Based on this context, different objectives have been established in this study.

First, the conditions that maximize production of the virulent and polyvalent staphylococcal bacteriophage vB_SauM-philPLA-RODI were defined by applying Response Surface Methodology (RSM) to determine the optimal propagation conditions when using a food-grade strain (*S. xylosus* CTC1642) as host. The effect of four variables (initial bacterial and phage concentrations, temperature and agitation) on phage yield (response) was studied, with temperature and initial bacterial concentration being the variables with a significant influence on the process. The maximum experimental phage yield obtained was $9.3 \log_{10}$ PFU/ml, while the one predicted by the model under optimized conditions was $9.25 \pm 0.30 \log_{10}$ PFU/ml. This performance is comparable to that obtained with the original host *S. aureus* IPLA1. It was also found that phage philPLA-RODI showed the same host range and a very similar ability to eliminate biofilms, independently of the staphylococcal species used for its propagation.

On the other hand, the viability and stability of four phages belonging to two families were studied: *Siphoviridae* (vB_SauS-philPLA35, vB_Sauphi-IPLA88) and *Myoviridae* (vB_SauM-philPLA-RODI and vB_SepM-philPLAC1C) during storage under five conditions: refrigeration, freezing (-20°C, -80°C, -196 °C), freeze-drying, spray-drying, presence of various cryoprotectors (disaccharides, glycerol, sorbitol and skimmed milk) and encapsulation with alginate. All phage lysates showed good viability after 24 months frozen at low temperatures (-80°C and -196°C), independently of the cryoprotector used. In the case of freeze-drying and spray-drying, the main losses occurred during the drying process, being stable during storage at 4°C even after 12-24 months. Skimmed milk provided good protection during freeze-drying of the four phages and spray-drying of two phages (philPLA-RODI and philPLA88). Trehalose also showed good properties during spray-drying and allowed phage philPLA88 to be stored at 20°C for, at least, 12 months. When encapsulated in alginate capsules, phage philPLA-RODI retained a high viability during storage at 4°C for 6 months and at 20°C for 1 month. These results suggest that encapsulated phages could be a suitable way for shipping phages.

Another objective was the design of formulations suitable for improving the stability of phage philPLA-RODI in different types of vesicles, against factors such as temperature, pH, and the presence of salts. The three types of vesicles (niosomes, liposomes and transfersomes) allowed the successful encapsulation of phage philPLA-RODI (encapsulation efficiency between 62%-98%), regardless of the concentration of the components used to prepare the vesicles.

The infectivity of the encapsulated phage was maintained for 6 months at 4°C for all three types of vesicles, with the exception of liposomes containing a low concentration of pronanosome Lipo-N™ (30 mg/ml). At high salt concentration, the phage was not affected, but the vesicles were completely destabilized. Niosomes presented more interesting results by partially protecting phage particles at a low pH and elevated temperature.

Finally, we studied the existence of synergistic or antagonistic interactions between the antistaphylococcal phage philPLA-RODI and several disinfectants (benzalkonium chloride,



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

triclosan, chlorhexidine and hydrogen peroxide) used in different clinical and industrial environments. The potential impact on the effectiveness of these methods for eliminating pathogenic bacteria was demonstrated by the combined use of disinfectants and phage. Our results suggest that benzalkonium chloride would be the most suitable disinfectant for use in environments where phages should be applied, since the combination of both did not result in the loss of antimicrobial activity.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN _____

Resumen

Las propiedades antimicrobianas de los bacteriófagos los convierten en una alternativa prometedora a los antibióticos y a los desinfectantes, en aplicaciones como la terapia fágica, el biocontrol de alimentos y la desinfección de superficies. Tales aplicaciones requieren el desarrollo de estrategias que aseguren su producción a gran escala, la viabilidad de las partículas fágicas durante los procesos de formulación, y su estabilidad durante el almacenamiento y distribución. En este contexto se ha desarrollado el trabajo de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, se han definido las condiciones que maximizan la producción del bacteriófago estafilocócico virulento y polivalente vB_SauM-philPLA-RODI mediante la aplicación de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para lo cual se ha utilizado como hospedador la cepa de grado alimentario, *Staphylococcus xylosus* CTC1642. Se ha estudiado el efecto de cuatro variables (concentración bacteriana y fágica inicial, temperatura y agitación), sobre el rendimiento fágico (respuesta), siendo la temperatura y la concentración inicial bacteriana, las variables con una influencia significativa en el proceso. El máximo rendimiento fágico experimental obtenido fue de $9,3 \log_{10}$ UFP/ml, que se acerca al valor de $9,25 \pm 0,30 \log_{10}$ UFP/ml propuesto por el modelo en las condiciones óptimas (135 rpm, 38°C, $7,07 \log_{10}$ UFC/ml iniciales y $6,00 \log_{10}$ UFP/ml iniciales), con una deseabilidad de 0.96. Este rendimiento es comparable al obtenido con el hospedador original *S. aureus* IPLA1. Además, se comprobó que el fago philPLA-RODI mostraba el mismo rango de hospedador y una capacidad de eliminación de biopelículas muy similar, independientemente de la especie de estafilococo utilizada para su propagación. Los resultados obtenidos respaldan el uso de una cepa de grado alimentario como una alternativa apropiada a la cepa patógena para la propagación del bacteriófago (philPLA-RODI). Además, cabe destacar la utilidad de la MSR para definir las condiciones óptimas del proceso de propagación.

Por otro lado, se estudiaron la viabilidad y estabilidad de cuatro fagos pertenecientes a dos familias *Siphoviridae* (vB_SauS-philPLA35, vB_SauS-phi-IPLA88) y *Myoviridae* (vB_SauM-philPLA-RODI y vB_SepM-philPLA-C1C), bajo distintas condiciones de formulación en las que se utilizaron varios agentes conservantes (disacáridos, glicerol, sorbitol y leche descremada) y de almacenamiento (refrigeración, congelación (-20°C, -80°C, -196°C), liofilización, secado por pulverización y encapsulación con alginato). Todas las suspensiones de fagos mostraron una buena viabilidad a bajas temperaturas (-80°C y -196°C) tras 24 y 12 meses congelados, respectivamente, e independientemente del crioprotector utilizado. En el caso de la

Resumen

liofilización y el secado por pulverización, las principales pérdidas de viabilidad se produjeron durante el proceso de secado, siendo estables durante su almacenamiento tras 12-24 meses a 4°C. La leche descremada proporcionó una buena protección en la liofilización de los cuatro fagos y en el secado por pulverización de dos fagos (philPLA-RODI y philPLA88). La trehalosa mostró también buenas propiedades durante el secado por pulverización y permitió el almacenamiento del fago philPLA88 a 20°C durante al menos 12 meses. El fago philPLA-RODI encapsulado en alginato retuvo una alta viabilidad cuando se almacenó a 4°C durante 6 meses y a 20°C durante 1 mes, lo que sugiere que la encapsulación podría ser también una forma adecuada para el transporte de fagos.

Asimismo, se diseñaron distintas formulaciones para mejorar la estabilidad del fago philPLA-RODI frente a factores como temperatura, pH, y presencia de sales. Para ello, se ensayaron tres tipos de vesículas (niosomas, liposomas y transferosomas), las cuales permitieron una encapsulación exitosa del fago (eficiencia de encapsulación entre 62%-98%), independientemente de la concentración de los componentes estructurales de cada vesícula (Pronanosome Nio-N™, Pronanosome Lipo-N™ y Phospholipon 90G:Span 60 (1:1)). Además, la infectividad del fago encapsulado se mantuvo durante 6 meses a 4°C para los tres tipos de vesículas, con la excepción de los liposomas que contenían una baja concentración de Pronanosome Lipo-NTM (30 mg/ml). A altas concentraciones de sal la viabilidad del fago no se vio afectada, pero todas las vesículas se desestabilizaron totalmente, dando lugar a la liberación de las partículas fágicas al exterior. Finalmente, los niosomas resultaron ser las vesículas más interesantes, al presentar una mayor protección del fago frente a pHs bajos y temperaturas elevadas, en comparación con los liposomas y transfersomas. De hecho, los fagos encapsulados en niosomas mostraron bajadas en el título inferiores a 2 unidades logarítmicas tras una hora a pH 4,5 y de menos de 3 unidades logarítmicas tras someter las muestras a 60°C durante 90 minutos. El resto de vesículas no ofrecieron protección, a excepción de los liposomas, para los que el título fágico disminuyó 2-3 unidades logarítmicas a pH 4,5.

Por último, se estudió la existencia de interacciones sinérgicas o antagónicas entre el fago philPLA-RODI y varios desinfectantes (cloruro de benzalconio, triclosán, clorhexidina y peróxido de hidrógeno) utilizados en entornos clínicos e industriales. Se comprobó la posible interferencia en la eficacia de los mismos para eliminar bacterias patógenas cuando se utilizan desinfectantes y fago de forma combinada. Nuestros resultados sugieren que el cloruro de benzalconio sería el desinfectante más adecuado para usar en ambientes donde se apliquen fagos, ya que la mezcla de ambos antimicrobianos no provoca una disminución de la eficacia de ninguno de ellos.

Agradecimientos

Es un placer disponer de un apartado en el que poder expresar mis agradecimientos a todas las personas e instituciones, que han contribuido al desarrollo de esta Tesis Doctoral, y que sin su participación hubiese sido imposible llevar a término este trabajo.

En primer lugar, me gustaría agradecer de manera especial y sincera a mis directoras de Tesis, a la Dra. Pilar García y la Dra. Beatriz Martínez, por aceptarme para realizar esta Tesis Doctoral bajo su dirección. Gracias en primer lugar por su confianza en mí, su orientación, disposición y aporte de conocimientos, además de haberme facilitado siempre todo lo necesario para llevar a cabo los objetivos planteados durante la realización de la Tesis. Este agradecimiento es extensivo a la Dra. Ana Rodríguez, por su importante aporte y participación activa en el desarrollo del trabajo. Gracias a la tres por vuestra generosidad, tanto a nivel científico como personal, por entender mis limitaciones en muchos aspectos y por vuestra infinita paciencia en todo momento.

También quiero agradecer a las directoras del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), la Dra. Clara González de los Reyes Gavilán y la Dra. María Fernández García, por haberme dado la posibilidad de realizar la Tesis en este centro. Y a mis tutoras, la profesora Rosario Rodicio y la Dra. Clara González, por haberme ayudado en los temas burocráticos.

A la Profesora Susana Luque, por su amabilidad y disponibilidad en mis visitas a la Facultad de Químicas de la Universidad de Oviedo para la realización de varios experimentos, durante las cuales tuve todo el soporte profesional y logístico para alcanzar los objetivos perseguidos.

Quiero extender un sincero agradecimiento al Dr. Daniel Pando, gerente de la empresa Nanovex S.L., por su paciencia e implicación, y por compartir su experiencia y amplio conocimiento sobre el mundo de la encapsulación, así como por aprobar mi estancia en sus instalaciones, lo que me ha permitido conocer los procesos relacionados con las diferentes técnicas de encapsulación. Finalmente, le agradezco también por sus siempre concretas y rápidas respuestas a las diferentes dudas surgidas durante el desarrollo de este trabajo, lo cual se ha visto reflejado en los buenos resultados obtenidos.

A los doctores, Antonio Garrido-Fernández y Francisco Noé Arroyo-López, por compartir sus conocimientos en el mundo de los modelos matemáticos y la simulación, y

Agradecimientos

sobre todo por su ayuda y paciencia para explicar de forma sencilla lo más complicado. Todo ello ha resultado en un exitoso trabajo conjunto.

Al grupo del “coffee break”, gracias al cual salíamos de la rutina y nos echábamos unas risas, de hecho, se nos hacía corto un café. Gracias a Lucía, cuya llegada al laboratorio fue un apoyo incuestionable, siempre accesible, a la que siempre podías preguntar y obtenías una respuesta, y todo acompañado de una sonrisa imperturbable. Y este agradecimiento es extensible a Susana, cuya llegada fue en paralelo, y quién siempre estaba disponible, sin esperar nada a cambio, cuando algo se te había olvidado en el laboratorio o necesitabas algún favor. Gracias Ana B, por tu profesionalidad, esa facilidad y paciencia para explicar todo y generosidad por acceder a ir a la otra cafetería...y mostrar siempre esa preocupación por los demás. A Jorge por aguantarnos a todas, eso demuestra valentía y habrá que perfeccionar nuestras habilidades en el “escape room” para que la próxima vez salgamos a tiempo. A Silvia Mex, por ser capaz de seguirme cuando me embalo hablando y tener siempre un detalle cada vez que ibas y venías en tus viajes. A Seila que aunque durante un tiempo más limitado, has dejado huella por esa naturalidad y me has tenido también que aguantar, espero te hayas quedado con lo mejor de mí. A Flor, el torbellino argentino con sangre de Mieres, una suerte conocer a personas con tanta energía y con las que es tan fácil conectar. A Lore por mostrar siempre esa sonrisa y con quién aprendí mucho del mundo animal en las horas de café.

A Ro, por iniciarme en el cacharreo y ser mis primeros ojos y manos en el laboratorio, además que mi contrincante en las carreras por los pasillos, por nuestra tendencia a ir siempre con prisas. A Cla, que aunque coincidimos menos tiempo, fue una suerte conocer a una persona tan positiva, accesible y que tiene esa habilidad de crear buen rollo. A Diana, quién siempre tenía un protocolo que dejarme y disponible para explicarme cualquier duda y como no, muchas gracias por descubrir a phiIPLA-RODI, sin él esta Tesis no existiría. A Esther y Rocío por esas charlas en el laboratorio y tener que preparar un sinfín de placas “finas” todas las semanas. A Lorena R por acordarte de mis experimentos de secado y mandarme documentación interesante en la distancia.

A Juan por esas conversaciones, en el laboratorio o en cocina, por esperar siempre mis llegadas *in extremis* para el autoclave, muchas gracias. También a Javi, siempre dispuesto, y gracias al cual, el centro seguía funcionando y todos podíamos continuar nuestro trabajo, y al que quizás debiéramos agradecerle su trabajo más a menudo.

Agradecimientos al resto de investigadores y miembros de los diferentes grupos de investigación del IPLA, a los técnicos, personal administrativo, doctorandos/as, becarios/as y “postdocs”, que han sido muchos, mis palabras de agradecimiento por hacer más fácil este camino y recordarme, la importancia del contacto humano para poder conseguir nuestras metas. En especial me gustaría hacer mención a mis compañeros de despacho, Alicia, siempre incansable, con quién compartía esas clases de inglés con Charly a primera hora de la mañana y nuestras conversaciones de despacho. A Silvia, David y Nuria, pura energía y con quienes siempre el humor estaba presente. A Víctor, fuente de conocimiento, que desde que se cambió de despacho dejó de haber peregrinaje por allí. Igualmente al resto de compañeros que sufrimos en este duro trayecto de ser doctorandos, y acudimos a esas sesiones de comisión de seguimiento: Arancha, Natalia y “Lucías”. Mi agradecimiento también, a los compañeros y estudiantes que han pasado por el laboratorio: Diego, Nohemy, Juliana, Susana, Sara, Miguel, Adrián, Estefi y sé que algunos más, que espero me disculpen, pues nunca he sido muy buena con los nombres.

Y como no, mi agradecimiento a mi pareja, la familia y los amigos, por su apoyo, su preocupación, su ánimo e inestimable ayuda a lo largo de estos años, sobre todo en los momentos duros, en los que no han dudado ni un momento en mi capacidad para sacar adelante la Tesis. Gracias por esa confianza ciega en mí. Y de forma muy especial a mis dos compañeras inseparables de viaje: mi hermana Silvia, con la que llevo compartiendo todos estos años, no solo como hermana sino como compañera de estudios, de trabajo y ahora en esta etapa de largo recorrido que ha sido la Tesis, gracias por estar siempre ahí para todo. Y a M^a Jesús, que apareció en nuestras vidas y ha sido un regalo del destino el conocerla, implacable y siempre con ganas para todo, nunca se le acaba la pila. Las tres llevamos juntas tanto tiempo que somos un trío inseparable, como olvidar esos momentos de idas y venidas en coche inolvidables y fructíferos, juntas nos hacemos mejores y nos completamos en todos los sentidos. ¡¡¡Mil Gracias a tod@s!!!

Agradecimientos

Índice de contenido

Resumen	i
Agradecimientos	iii
Índice de contenido	vii
Índice de figuras y tablas	ix
Abreviaturas	xi
Introducción	1
1 Los bacteriófagos	1
1.1 Características generales.....	1
1.1.1 Taxonomía	1
1.1.2 Ciclos de desarrollo.....	3
1.2 Factores que influyen en el proceso de propagación de un bacteriófago ...	6
1.2.1 Microbiología predictiva y modelos matemáticos.....	8
1.3 Aplicaciones de los bacteriófagos	9
1.4 Técnicas de conservación y formulación	13
1.4.1 Refrigeración y congelación de suspensiones líquidas de bacteriófagos.....	13
1.4.2 Encapsulación de bacteriófagos.....	14
2 El género <i>Staphylococcus</i>	21
2.1 Características generales.....	21
2.2 Patogenicidad de <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>	22
2.2.1 Factores de virulencia	23
2.2.2 Formación de biofilms o biopelículas.....	25
2.2.3 Resistencia a los antibióticos	25
Antecedentes y Objetivos	29
Resultados	31
1 Optimización de la propagación del bacteriófago vB_SauM-phiPLA-RODI que infecta a <i>S. aureus</i> , utilizando la metodología de superficie de respuesta	31

Índice de contenido

2	Análisis comparativo de diferentes técnicas de conservación y formulación para cuatro fagos de <i>Staphylococcus</i>	49
3	Estudio y mejora de la estabilidad del bacteriófago phiIPLA-RODI en diferentes condiciones de temperatura, pH, salinidad y presencia de desinfectantes químicos	65
	Discusión	93
1	La metodología de superficie de respuesta permite optimizar la propagación de fagos en hospedadores alternativos no patógenos.....	93
2	Técnicas de conservación y formulación para fagos de <i>Staphylococcus</i> en función de su aplicación final.....	97
3	La encapsulación mejora la estabilidad del bacteriófago phiIPLA-RODI frente a condiciones ambientales hostiles	105
4	Incompatibilidad del uso combinado del bacteriófago phiIPLA-RODI con algunos desinfectantes a concentraciones habituales en la industria alimentaria	109
	Conclusiones	113
	Referencias bibliográficas	115
	Anexos	133
1	Factor de impacto de las publicaciones presentadas.....	133
2	Material suplementario del CAPÍTULO 1, Artículo 1	134

Índice de figuras y tablas

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación de los principales virus que infectan a bacterias y arqueas	2
Figura 2. Representación esquemática de la estructura de un bacteriófago	3
Figura 3. Ciclos de desarrollo de un fago	4
Figura 4. Equipo de secado por pulverización a escala laboratorio utilizado en el estudio. A): Esquema gráfico. B): Fotografía del equipo.	17
Figura 5. Esquema estructural de diferentes vesículas. A): Liposomas. B): Niosomas. C) Transferosomas.....	20
Figura 6. Proceso de formación de un biofilm indicando las principales fases de desarrollo	25
Figura 7. Evolución temporal de la resistencia a antibióticos	26

Índice de Tablas

Tabla 1. Empresas y productos comerciales basados en bacteriófagos.	12
Tabla 2. Técnicas de encapsulación aplicadas a bacteriófagos.....	15
Tabla 3. Factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	24
Tabla 4. Reducción del título fágico de phiPLA35 y phiPLA88 (<i>Siphoviridae</i>).	99
Tabla 5. Reducción del título fágico de phiPLA-RODI y phiPLA-C1C (<i>Myoviridae</i>).	100

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AMP: *Antimicrobial peptides* (péptidos antimicrobianos).

ARN: Ácido ribonucleico.

CA-MRSA: *Community acquired methicillin resistant S. aureus*.

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro para la prevención y control de enfermedades).

DMSO: dimetilsulfóxido.

ECDC: *European centre for disease prevention and control* (Centro europeo para la prevención y control de enfermedades).

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria).

FDA: *Food and drug administration* (Administración de Alimentos y Medicamentos).

GRAS: *Generally regarded as safe* (Generalmente reconocido como seguro).

ICTV: *International committee on taxonomy of viruses* (Comité internacional para la taxonomía de virus).

LPSN: *List of prokaryotic names with standing in nomenclature* (Listado de Nombres Procariotas con Posición en Nomenclatura).

LA-MRSA: *Livestock associated methicillin resistant S. aureus* (*S. aureus* resistente a la meticilina asociado al ganado).

MRSA: *Methicillin resistant S. aureus* (*S. aureus* resistente a la meticilina).

MRSE: *Methicillin resistant S. epidermidis* (*S. epidermidis* resistente a meticilina).

MSCRAMM: *Microbial surface component-recognizing adhesive matrix molecule* (Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz).

MSR: Metodología de superficie de respuesta.

ODRI: *orthopedic device-related infection* (infección relacionada con dispositivos ortopédicos).

PAS: *Phage-antibiotic synergy* (sinergia fago-antibiótico).

PBS: *Phosphate-buffered saline* (Tampón fosfato salino).

PSMs: *Phenol-soluble modulins* (Modulinas solubles en fenol).

SaPIs: *S. aureus pathogenicity islands* (Islas de patogenicidad de *S. aureus*).

SCC: *Staphylococcal chromosomal cassette* (cassette cromosómico estafilocócico).

SEs: *Staphylococcal enterotoxins* (enterotoxinas estafilocócicas).

TFH: *Thin film hydration* (hidratación de película fina).

UE: Unión europea.

USDA: *United States department of agriculture* (Departamento de agricultura de los Estados Unidos).

1 Los bacteriófagos

1.1 Características generales

Los bacteriófagos son virus que infectan a bacterias. Fueron descubiertos en 1915 por el microbiólogo Frederick W. Twort, pero sería Félix d'Hérelle, dos años después, quien reconocería su naturaleza viral y actividad específica frente a las bacterias, y de ahí, que los denominase bacteriófagos o fagos (comedores de bacterias, del griego phagētón; alimento/ingestión). Dado que las Arqueas no son bacterias, los virus que las infectan no pueden ser calificados como bacteriófagos, reservándose este término únicamente para los virus bacterianos.

Los bacteriófagos son las entidades biológicas más abundantes en el planeta; se estima que existen alrededor de 10^{31} partículas virales en la Tierra, con una proporción de 10:1 en relación con las bacterias a las que infectan, y por lo tanto, con un importante papel ecológico (Clokic, Millard, Letarov, & Heaphy, 2011). Se han descrito hasta 5.500 bacteriófagos distintos capaces de infectar a una gran diversidad de hospedadores bacterianos, siendo un 96% de los mismos pertenecientes al orden *Caudovirales* (fagos con cola) (Ackermann, 2007). Desde el punto de vista científico, su estudio ha servido para comprender múltiples aspectos de la biología molecular y, también, para desarrollar importantes herramientas biotecnológicas, así como nuevos agentes terapéuticos (Clokic et al., 2011).

1.1.1 Taxonomía

El desarrollo del microscopio electrónico en la década de 1940 permitió la identificación de diferentes morfologías virales (Figura 1). Los fagos están formados por material genético (una molécula de ácido nucleico de cadena doble o simple) rodeado por una envoltura proteica o lipoproteica (cápsida), que varía en su forma y tamaño de unos a otros, y pueden presentar o no una cola (Bradley, 1967).

La clasificación aceptada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses), basada en la morfología de la partícula viral y la naturaleza del ácido nucleico, establece dentro del orden *Caudovirales* tres familias: *Myoviridae*, fagos con cola contráctil compuesta por una vaina y un tubo central, *Siphoviridae* con cola larga, no contráctil y *Podoviridae* con cola corta (Ackermann, 2007).

Introducción

Recientemente, el ICTV ha incluido dos nuevas familias dentro de este orden: la familia *Ackermanviridae*, fagos con cola contráctil, relacionados con el fago de *Salmonella* Vil, asignados anteriormente al género *Viunalikeyirus*; y la familia *Herelleviridae*, grandes fagos de cola contráctil, relacionados con el fago SPO1 de *Bacillus*, los fagos Twort y K de *Staphylococcus*, el fago P100 de *Listeria* y el fago ϕ EF24C de *Enterococcus*, la mayoría previamente agrupados en la subfamilia *Spounavirinae* (Barylski et al., 2019).


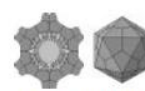









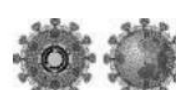







	ADN			ARN
Cadena simple	 <i>Inoviridae</i>	 <i>Microviridae</i>	 <i>Pleolipoviridae</i>	 <i>Leviviridae</i>
Cadena doble	 <i>Ampullavirus</i>	 <i>Corticoviridae</i>		
	 <i>Bicaudaviridae</i>	 <i>Plasmaviridae</i>		
	 <i>Fuselloviridae</i>			
	 <i>Globuloviridae</i>	 <i>Tectiviridae</i>		 <i>Cystoviridae</i>
	 <i>Guttaviridae</i>	<u><i>Caudovirales</i></u>		
	 <i>Lipothrixviridae</i>	 <i>Myoviridae</i>		
	 <i>Rudiviridae</i>	 <i>Siphoviridae</i>		
	 <i>Salterprovirus</i>	 <i>Podoviridae</i>		

Figura 1. Clasificación de los principales virus que infectan a bacterias y arqueas. [Adaptación de King, Lefkowitz, Adams, y Carstens (2011); <https://viralzone.expasy.org>].

Los bacteriófagos del orden *Caudovirales* se caracterizan por presentar una doble cadena de ADN empaquetada en una cabeza icosaédrica, la cual está unida a una cola (contráctil o no) formada por proteínas, y a través de la cual los bacteriófagos inyectan el material genético en la bacteria. En el extremo de la cola se localizan la placa basal, las espinas y las fibras donde se encuentran las proteínas de reconocimiento, unión y fijación a la bacteria (Ackermann, 2003; Bradley, 1967) (Figura 2).

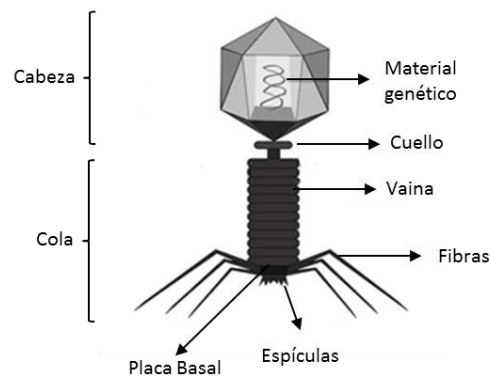


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de un bacteriófago.

1.1.2 Ciclos de desarrollo

Los bacteriófagos, como ocurre con el resto de virus, necesitan de una célula hospedadora para poder multiplicarse. En función del ciclo de vida que un bacteriófago pueda llevar a cabo, se clasifica como virulento (ciclo lítico) o atemperado (ciclo lisogénico y ciclo lítico) (Figura 3).

El ciclo de desarrollo de un bacteriófago tiene lugar en varias fases o etapas. En una primera fase, se produce la adsorción y unión del fago a la célula hospedadora, proceso facilitado por la placa basal. El fago se une a receptores específicos en la superficie celular bacteriana a través de las fibras y/o proteínas de la cola. Así, por ejemplo, en fagos que infectan a *Staphylococcus aureus*, estos receptores son los ácidos teicoicos que están anclados a la pared bacteriana (Xia & Wolz, 2014). Posteriormente, gracias a la acción de las peptidoglicano hidrolasas, proteínas estructurales que forman parte de la partícula viral, se forma un pequeño poro en la envuelta de la célula bacteriana a través del cual se inyecta su material genético (ADN o ARN, de cadena doble o simple) (Rodríguez-Rubio, Martínez, Donovan, Rodríguez, & García, 2013). En ese momento, los bacteriófagos atemperados pueden seguir dos vías: secuestrar la maquinaria celular del hospedador para su propia replicación, entrando en un ciclo lítico, o alternatively, entrar en un estado latente, conocido como ciclo lisogénico, en el que el material genético del fago se integra en el cromosoma bacteriano como profago (Figura 3) (Feiner et al., 2015).

Cuando un número elevado de fagos se adsorben a la misma célula bacteriana, en algunos casos, se generan múltiples poros por la acción de las peptidoglicano hidrolasas, que provocan la destrucción de la pared y la liberación del contenido celular, fenómeno conocido como lisis “desde fuera”. En este caso, se produce una infección no productiva de fagos que mata a la bacteria (Abedon, 2011).

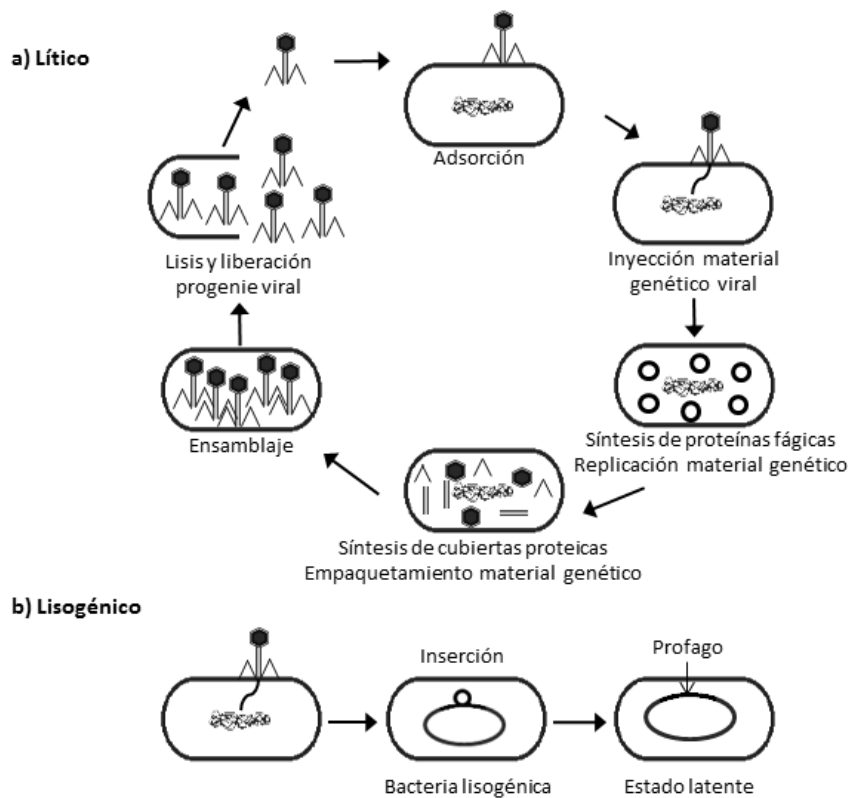


Figura 3. Ciclos de desarrollo de un fago. [Adaptación de Feiner (2015)]

Ciclo lítico: en este proceso también denominado infección virulenta, el fago inyecta su ADN en el hospedador y sintetiza proteínas tempranas lo que permite que el fago tome el control del metabolismo de la bacteria para dar lugar a la formación de nuevas partículas fágicas. El genoma del fago se replica y, posteriormente, es empaquetado en el interior de la cápsida. Las cabezas y las colas se ensamblan y se forman los nuevos viriones. Como resultado de este proceso, las células hospedadoras se debilitan gradualmente por las enzimas fágicas y finalmente, se produce la lisis de la bacteria, liberando la nueva progenie de fagos en el ambiente circundante.

La lisis bacteriana “desde dentro” puede producirse por inhibición de la síntesis del peptidoglicano en fagos con ADN o ARN de cadena simple (Bernhardt, Wang, Struck, & Young, 2002), o mediante hidrólisis enzimática del peptidoglicano, en el caso de fagos de ADN de cadena doble, a través del sistema holina-endolisina. Las holinas dan lugar a poros en el membrana citoplasmática a través de los cuales acceden las endolisinas a su sustrato y degradan el peptidoglicano, produciéndose la lisis bacteriana (Schmelcher & Loessner, 2014). La liberación de la progenie viral, en el caso de los fagos filamentosos Ff, no provoca

la lisis ni la muerte bacteriana, ya que son liberados de forma continua desde el interior (Bennett, Gagic, Sutherland-Smith, & Rakonjac, 2011).

La duración y productividad del ciclo de vida lítico se define por varios parámetros, los cuales se obtienen mediante la curva de desarrollo en un paso:

- Período de latencia: tiempo transcurrido desde la infección hasta la liberación de la progenie viral.
- Período de eclipse: es menor que el anterior y es el tiempo que transcurre desde la infección hasta la formación de las partículas fágicas en el interior de la bacteria.
- Tamaño de explosión: número de fagos que se liberan por cada célula que ha sido infectada por un único fago.

Ciclo lisogénico: en este proceso también denominado infección no virulenta o atemperada, el fago se une y adsorbe a la superficie celular bacteriana inyectando su ADN e integrándose éste en el genoma bacteriano (profago) con la ayuda de recombinasas (integrasas y escisionasas) codificadas por el fago. Las células bacterianas que contienen profagos se conocen como "lisógenos". A medida que la célula lisogénica se replica, también lo hace el profago insertado en el cromosoma de la bacteria, transmitiéndose así a todas las células hijas (Feiner et al., 2015).

Si una bacteria que contiene profagos está expuesta a condiciones ambientales estresantes que producen daños en el ADN, como la luz UV, calor o sustancias químicas como la mitomicina C, se produce la activación de la respuesta SOS, y el ADN del profago puede liberarse del cromosoma del hospedador e iniciar el ciclo lítico en un proceso llamado inducción (Oppenheim, Kobilier, Stavans, Court, & Adhya, 2005).

La lisogenia establece una relación simbiótica entre el fago y su hospedador, conocida como conversión lisogénica, proporcionando aptitudes y ventajas evolutivas a la bacteria lisogénica. La más común es la protección contra la infección por fagos semejantes, fenómeno conocido como inmunidad a la superinfección. También es conocido que la conversión lisogénica permite la expresión de proteínas codificadas por el fago en la bacteria hospedadora, confiriéndole nuevas capacidades (Feiner et al., 2015).

La inducción del ciclo lítico del fago no es un proceso perfecto; a veces los profagos pueden incorporar un fragmento del ADN de la bacteria cuando tiene lugar el proceso de escisión, o incluso, empaquetar ADN bacteriano exclusivamente. Cuando estos fagos

Introducción

infectan una nueva célula hospedadora, le transfieren los genes de la bacteria anteriormente infectada. Este fenómeno se denomina transducción, proceso mediado por fagos por el cual, los genes de resistencia a los antibióticos, los genes que codifican toxinas y otros caracteres de virulencia, pueden propagarse a través de una población bacteriana (Brown-Jaque, Calero-Cáceres, & Muniesa, 2015; Fortier & Sekulovic, 2013). Un ejemplo destacable se observa en *S. aureus* cuya diversidad está determinada principalmente por la presencia de elementos genéticos móviles, muchos de los cuales son profagos o islas genómicas, como las islas de patogenicidad (SaPIs), relacionadas con fagos (Xia & Wolz, 2014; Novick, Christie, & Penadés, 2010).

1.2 Factores que influyen en el proceso de propagación de un bacteriófago

El proceso de propagación de un bacteriófago se realiza a través del ya comentado ciclo lítico y se ve afectado por la interacción entre el fago y la bacteria hospedadora: estado fisiológico de la bacteria, concentraciones iniciales de bacteria y fago, así como por otros factores ambientales: temperatura, presencia de nutrientes, pH, tiempo de incubación, agitación y presencia de iones, entre otros.

Existen múltiples estudios que han puesto de manifiesto la influencia de la concentración de la bacteria y del estado fisiológico de la misma en la propagación de los fagos (Nabergoj, Modic, & Podgornik, 2018). Hadas y colaboradores encontraron que al aumentar la tasa de crecimiento de la población bacteriana, se incrementaba la tasa de adsorción y liberación, así como el tamaño de explosión del fago T4, mientras que el período de eclipse y latencia disminuían (Hadas, Einav, Fishov, & Zaritsky, 1997), lo que favorece el proceso de propagación del bacteriófago. La disponibilidad de nutrientes afecta al crecimiento de la bacteria hospedadora y, por tanto, los medios más ricos también favorecen un mayor rendimiento en la producción de fagos (Warner et al., 2014). De hecho, una alta concentración inicial de bacterias, si no se complementa con una mayor cantidad de nutrientes que permita aumentar la tasa de crecimiento, conduciría a una disminución en la producción de fagos (Santos, Carvalho, Azeredo, & Ferreira, 2014).

También se ha analizado el efecto de la concentración inicial de fago en el título fágico final. En términos generales, un título de fago inicial alto da lugar a una mayor concentración final de fago y una población bacteriana más baja (Santos et al., 2014). No obstante, aunque la carga viral inicial puede determinar el título fágico final, esta variable

está claramente influenciada por la concentración bacteriana (Rajnovic, Muñoz-Berbel, & Mas, 2019).

Es interesante destacar el efecto sinérgico de algunos antibióticos en la propagación de determinados fagos (Phage-Antibiotic Synergy, PAS). Así, se observó un efecto sinérgico fago-antibiótico al combinar el fago Φ MFP y la cefotaxima a concentraciones sub-letales frente a *Escherichia coli*. Al incrementar la concentración de cefotaxima aumentó la concentración de fagos y el tamaño de las placas de lisis, debido a un aumento del tamaño de explosión y a una disminución del tiempo de latencia (Comeau, Tétart, Trojet, Prère, & Krisch, 2007).

En relación a la temperatura, ésta resulta ser uno de los factores con mayor influencia en el rendimiento de los bacteriófagos durante su propagación. Así, algunos estudios han mostrado que la temperatura óptima para dicha propagación suele estar próxima a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria hospedadora (Binetti, Quiberoni, & Reinheimer, 2002; Quiberoni & Reinheimer, 1998; Watanabe et al., 1993). No obstante, estudios más recientes concluyen que, en ocasiones, esta temperatura puede diferir, lo que podría atribuirse a un equilibrio entre la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria hospedadora y la temperatura óptima de maduración y ensamblaje de las partículas fágicas (Grieco, Wong, Dunbar, MacGillivray, & Curtis, 2012; Warner et al., 2014; Ali, Rafiq, & Ratcliffe, 2019).

La influencia de otros factores en la producción de fagos, como el pH, está menos documentada, aunque se ha descrito su influencia en el proceso de propagación. Grieco y colaboradores (2012) demostraron que era una variable significativa y que la máxima producción de fagos filamentosos de *E. coli* se producía a un pH de 6.9. Por otro lado Fister y colaboradores (2016), comprobaron la eficacia del fago P100 de *Listeria monocytogenes*, observando replicación del fago en un rango de pH (6-10) y una efectividad máxima a pH 6-7.

Finalmente, la presencia de iones Ca^{2+} o Mg^{2+} mejora la tasa de adsorción de algunos fagos y permite una penetración eficiente del ADN en el interior de la bacteria. Así, se ha visto que la presencia de Ca^{2+} es imprescindible para completar el ciclo de algunos fagos y que se produzca la lisis celular (Binetti et al., 2002), mientras que en otros, aunque no resultó indispensable, sí permitió una lisis más rápida de los cultivos (Sechaud, Cluzel, Rousseau, Baumgartner, & Accolas, 1988).

1.2.1 Microbiología predictiva y modelos matemáticos

La influencia significativa de diferentes factores en la interacción fago-bacteria, y como consecuencia, la eficiencia del proceso de propagación de un bacteriófago, hacen conveniente acudir a herramientas como la microbiología predictiva para estudiar y predecir las condiciones óptimas de este proceso, de cara a su posible producción a escala industrial.

La microbiología predictiva se basa en la hipótesis de que la respuesta de los microorganismos a diversos factores ambientales es reproducible, y por lo tanto, es posible predecirla a partir de observaciones hechas bajo condiciones definidas y controladas. Utilizando dichas observaciones se construyen modelos matemáticos (ecuaciones) que nos permiten predecir la respuesta del microorganismo ante condiciones no evaluadas, pero que se encuentran dentro del rango de condiciones previamente ensayadas (Ross & McMeekin, 1994). El empleo de modelos matemáticos se ha utilizado en múltiples trabajos para el estudio y optimización de bioprocesos (García et al., 2019; Mandenius & Brundin, 2008).

Existen diferentes formas de categorizar estos modelos en microbiología predictiva; una de ellas diferencia entre modelos que describen el crecimiento y otras la inactivación microbiana. Dentro de cada categoría se subdividen en (Whiting, 1995):

- Modelos primarios: describen el cambio de la respuesta microbiana en función del tiempo.
- Modelos secundarios: describen el cambio de la respuesta microbiana incorporando nuevas variables y evalúan los modelos primarios frente a cambios en los factores ambientales como la temperatura o el pH.
- Modelos terciarios: son programas informáticos que transforman los modelos primarios y secundarios en herramientas de fácil manejo para los usuarios.

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un modelo matemático de tipo secundario basado en técnicas matemáticas y estadísticas. Su aplicación permite analizar una variable de interés (variable dependiente) y su relación con un conjunto de factores experimentales controlables (variables independientes), con el fin de obtener los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta. La MSR consta de varios pasos que se pueden agrupar de la siguiente manera (Montgomery, 2000; Myers, 2016):

- Diseño y experimentación: un diseño experimental es el conjunto específico de combinaciones de los niveles de las diferentes variables o factores que se utilizarán al llevar a cabo el experimento. La elección de un diseño adecuado del experimento resulta fundamental para modelizar y explorar la superficie de respuesta utilizada, ya que permite ajustar un modelo polinómico al conjunto de datos experimentales recogidos en los puntos del diseño.
- Modelización de la superficie de respuesta por regresión: se obtiene una curva o superficie a través de los puntos que resultan de la respuesta del problema estudiado y de la utilización de una función de regresión, denominada función base, que generalmente suele ser un polinomio de primer orden o segundo orden o está compuesta por términos que son funciones trigonométricas. Los coeficientes de la función base pueden ser estimados con una regresión matemática, utilizando el método de los mínimos cuadrados. El modelo empírico resultante es la denominada Superficie de Respuesta.
- Optimización y validación: Se localiza el óptimo buscado para la respuesta mediante herramientas gráficas y/o matemáticas para predecirlo, y posteriormente, se verifica experimentalmente. Se confirma el valor de la respuesta utilizando los niveles óptimos de los factores o variables independientes predichos por el modelo.

El uso eficaz de la microbiología predictiva ya ha sido demostrado en la optimización de procesos que utilizan bacteriófagos, como la inhibición de *S. aureus* por una mezcla de bacteriófagos en leche pasteurizada (Obeso et al., 2010) o para la optimización de la propagación de fagos filamentosos de *E. coli* (Grieco et al., 2012) y del bacteriófago K de *S. aureus* (Ali et al., 2019).

1.3 Aplicaciones de los bacteriófagos

El uso de los bacteriófagos para combatir bacterias patógenas, denominado fagoterapia o terapia fágica, se inició en 1919 por Félix D'Herelle para tratar a un niño de 12 años enfermo de disentería. En aquellos momentos hubo un gran interés en estudiar la naturaleza de los fagos y su posible uso como agentes terapéuticos, pero este fervor inicial se vio frenado con la aparición de la quimioterapia con antibióticos en la década de los 40. La terapia fágica únicamente siguió utilizándose en la antigua URSS, particularmente en el Instituto Eliava, un centro de referencia que mantiene su actividad en Tbilisi (Georgia), y también en Polonia, donde el Instituto Ludwick Hirszfeld de Inmunología y Terapia Experimental (Varsovia) posee una unidad de terapia fágica (Wittebole, De Roock, & Opal, 2014).

Introducción

Durante las 2 o 3 últimas décadas, la aparición y diseminación generalizada de bacterias resistentes a múltiples antibióticos ha provocado una crisis sanitaria a nivel mundial, con limitadas opciones terapéuticas y un elevado coste para los sistemas sanitarios. Como consecuencia, se están retomando los estudios sobre terapia fágica como una alternativa al uso de antibióticos (Abedon, García, Mullany, & Aminov, 2017; Fernández, Gutiérrez, Rodríguez, & García, 2018).

Los bacteriófagos son virus específicos de bacterias, y por lo tanto, inocuos para el ser humano y respetuosos con el medio ambiente. Por otro lado, los fagos ofrecen importantes ventajas frente al resto de agentes antimicrobianos entre las que destacan: su especificidad de hospedador, autoamplificación, inocuidad para el ser humano y el medio ambiente, eficacia contra las bacterias multirresistentes y su fácil manipulación genética. Además, su gran especificidad les permite atacar únicamente a las bacterias diana sin dañar otros microorganismos del entorno que pueden ser beneficiosos. No obstante, también presentan desventajas entre las que destaca el hecho de que las bacterias pueden adquirir resistencia a los fagos. Esta se puede minimizar mediante el uso de una mezcla de varios fagos (cócteles de fagos) (Fernández et al., 2018; Kutter et al., 2010). Asimismo, en los últimos años se ha estudiado también la utilización de proteínas fágicas (endolisinas y peptidoglicano hidrolasas asociadas al virión) como potenciales agentes antimicrobianos, por su capacidad para lisar bacterias Gram positivas cuando se añaden de forma exógena y para las que no se han detectado bacterias resistentes (Fernández et al., 2018; Rodríguez-Rubio et al., 2013).

A continuación se describen algunos ejemplos de aplicación de fagos en diferentes ámbitos (Fernández et al., 2018; García et al., 2008):

- Terapia fágica: los primeros ensayos clínicos en humanos realizados de forma controlada se llevaron a cabo en Estados Unidos, con la utilización de una mezcla de fagos contra *E. coli*, *S. aureus*, y *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con úlceras en la pierna, los cuales presentaron resultados satisfactorios sin efectos adversos (Rhoads et al., 2009). Actualmente, existen varios ensayos clínicos que han superado las fases I y II, lo que previsiblemente dará lugar a realizar los correspondientes en fase III (Vandenheuvél, Lavigne, & Brüssow, 2015). Aparte de estos, en algunos países se está aplicando la terapia fágica como terapia compasiva, amparada en el artículo 37 (Intervenciones no comprobadas en la práctica clínica) de la Declaración de Helsinki (World Medical Association, 2013), que permite el uso de tratamientos experimentales para aquellos pacientes que han

agotado las opciones terapéuticas aprobadas. Desde el año 2000, se han recogido hasta 29 casos de aplicación de fagos como terapia compasiva con éxito clínico (McCallin, Sacher, Zheng, & Chan, 2019).

La utilización de bacteriófagos y sus derivados frente a patógenos, también se ha explorado en otras áreas o sectores tales como: agricultura, veterinaria, seguridad alimentaria y el tratamiento de aguas residuales. Un claro ejemplo ha sido su aplicación en la producción primaria, ya que los animales de granja son reservorios y el origen de muchas zoonosis importantes como las ocasionadas por *Listeria*, *Campylobacter*, *Escherichia* y *Salmonella*. La eficacia de los bacteriófagos para reducir la colonización y las infecciones causadas por este tipo de bacterias ha sido evaluada con resultados satisfactorios en numerosos estudios utilizando aves de corral, cerdos, ovejas y vacas (Endersen et al., 2014).

- **Bioconservación:** en ciertos alimentos (alimentos frescos o productos precocinados), la eliminación de bacterias patógenas mediante el uso de tratamientos térmicos o químicos no es posible, ya que se alterarían sus propiedades organolépticas. Por tanto, el uso de bacteriófagos y de sus proteínas podría ser una estrategia complementaria en la eliminación de bacterias patógenas. Diferentes estudios han demostrado la eficacia de los fagos en la reducción de los niveles de *E. coli* en vegetales o en carne de vacuno, *Salmonella* en carne, *L. monocytogenes* en frutas y quesos o *S. aureus* en leche cruda (Viazis, Akhtar, Feirtag, & Diez-Gonzalez, 2011; García et al., 2008).
- **Biohigienización:** la dificultad para eliminar ciertos patógenos en superficies de instalaciones ganaderas, industrias alimentarias o entornos hospitalarios ha llevado a explorar la aplicación de fagos como agentes desinfectantes. En gran parte, este problema se deriva de la capacidad de algunos patógenos para formar biofilms altamente resistentes a los desinfectantes tradicionales y/o la resistencia cruzada entre biocidas y antibióticos (Hernández, Ruiz, Romero, & Martínez, 2011; Giaouris et al., 2014), y presenta el uso de bacteriófagos como una alternativa atractiva frente a los desinfectantes tradicionales (Gutiérrez, Rodríguez-Rubio, Martínez, Rodríguez, & García, 2016).

Por último, la prueba inequívoca de los resultados satisfactorios de los diferentes estudios de aplicación de los bacteriófagos, es la existencia de varias empresas en todo el mundo dedicadas a la comercialización de productos basados en fagos con diferentes aplicaciones (Tabla 1).

Introducción

Tabla 1. Empresas y productos comerciales basados en bacteriófagos.

Empresa (Ubicación)	Producto	Bacteria diana	Aplicación
CheilJedang Corporation (Corea del sur)	Biotector S1	<i>Salmonella enterica</i> ser Gallinarum	Pienso para aves
Erwiphage (Hungria)	Erwiphage PLUS	<i>Erwinia amylovora</i>	En plantas frutales
Intralix (EE.UU.)	ListShield™	<i>L. monocytogenes</i>	En alimentos y desinfección de superficies
	*SalmoFresh™	<i>Salmonella</i>	
	Ecoshield™	<i>E. coli</i>	
	ShigaShield™	<i>Shigella</i>	
MICREOS Food Safety BV (Países Bajos)	PLSV-1™	<i>Salmonella</i>	Profilaxis y tratamiento en aves de corral
	INT-401™	<i>Clostridium perfringens</i>	
	*PhageGuard Listex™	<i>L. monocytogenes</i>	En alimentos y desinfección de superficies
OmniLytix Inc. (EE.UU.)	*PhageGuard S™	<i>Salmonella</i>	En alimentos
	PhageGuard E™	<i>E. coli</i> O157: H7	
Passport Food Safety Solutions (EE.UU.)	Agriphage™	<i>Xanthomonas campestris</i> y <i>Pseudomonas syringae</i>	Frutas y verduras
	Finalyse™	<i>E. coli</i> O157: H7	Desinfección de superficies
	AviBrom®	<i>Campylobacter</i> y <i>Salmonella</i>	
Proteon (Polonia)	BoviBrom®	<i>E. coli</i> O157: H7 y <i>Salmonella</i>	Carne cruda de ave Carne de res
	Bafasal®	<i>Salmonella</i>	Profilaxis y tratamiento en aves de corral
	Bafador®	<i>Pseudomonas</i> y <i>Aeromonas</i>	Profilaxis y tratamiento en peces

* la FDA ha otorgado la designación GRAS

Sin embargo, es preciso señalar que actualmente no existe un reglamento en la UE que permita el uso de fagos como desinfectantes, bioconservantes o como tratamiento profiláctico de enfermedades infecciosas en pacientes, animales o plantas. En EE.UU., por el contrario, el Departamento de Agricultura (United States Department of Agriculture, USDA) permite la aplicación de ciertos fagos en animales y alimentos, siempre que cumplan con la Directiva del FSIS 7120.1 en relación a su finalidad, cantidad y etiquetado. Siguiendo los pasos de EE.UU, otros países como Israel, Canadá, Suiza, Australia y Nueva Zelanda, han emitido regulaciones similares (Fernández et al., 2018; Moye, Woolston, & Sulakvelidze, 2018).

1.4 Técnicas de conservación y formulación

El creciente interés en el uso de los bacteriófagos como agentes antimicrobianos para el biocontrol de patógenos ha generado la necesidad de desarrollar estrategias de conservación y formulaciones que garanticen la viabilidad y estabilidad de los mismos durante su almacenamiento a medio y largo plazo. Además, estas formulaciones deben de ser compatibles con su uso final, como puede ser su administración en terapia, en desinfección o en bioconservación.

Los bacteriófagos están compuestos de proteínas (con material genético en su interior), y como tales, son solo parcialmente estables en suspensión. Por tanto, al igual que ocurre con otras proteínas, las suspensiones de bacteriófagos se pueden preservar mediante la adición de estabilizantes de proteínas, o se pueden transformar en formulaciones estables a través de la liofilización, secado por pulverización o mediante la incorporación en matrices de polímeros biodegradables, o en micropartículas (Vandenheuvel et al., 2015).

1.4.1 Refrigeración y congelación de suspensiones líquidas de bacteriófagos

El almacenamiento de fagos (lisados crudos o purificados) a 4°C o su congelación a -20°C, -80°C o -196°C, son métodos utilizados tradicionalmente en los laboratorios para la conservación de volúmenes pequeños.

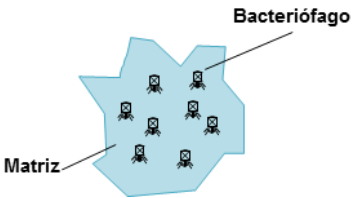
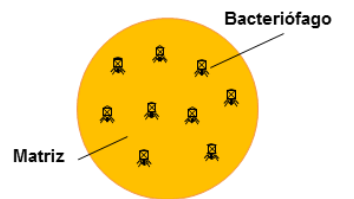
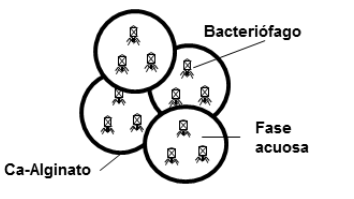
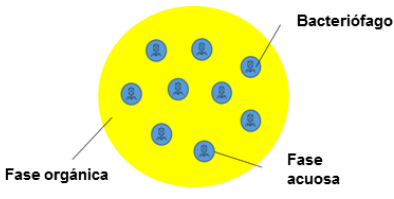
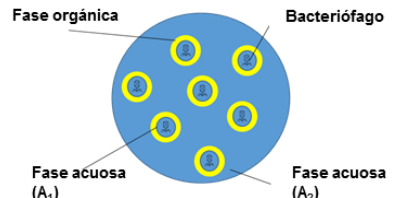
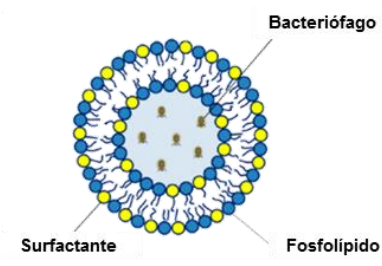
El almacenamiento de suspensiones acuosas a 4°C tiene una estabilidad limitada. Generalmente, se utilizan bajas concentraciones de sales, gelatina u otras proteínas como la caseína, la soja o la albúmina para mantener su estabilidad (Gill & Hyman, 2010), y se considera que la misma está limitada a un año (Merabishvili et al., 2013).

No obstante, el tiempo de estabilidad de los fagos aumenta al disminuir la temperatura de almacenamiento a -80°C o -196°C , aunque existen fagos inestables incluso en estas condiciones (Ackermann, Tremblay & Moineau, 2004). Es habitual el uso de aditivos crioprotectores para mantener la viabilidad de los bacteriófagos en procesos de congelación, tales como: sales, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), peptona bacteriológica, disacáridos, gelatina o goma arábica (Hubálek, 2003). Se sabe que la congelación rápida, temperaturas más bajas y la adición de ciertos agentes crioprotectores disminuyen la formación y el tamaño de cristales de hielo durante los procesos de congelación, protegiendo a los bacteriófagos del estrés mecánico que estos cristales pueden ejercer sobre las proteínas de la cápsida viral y sobre los ácidos nucleicos (Malenovská, 2014; Olson, Axler, & Hicks, 2004).

1.4.2 Encapsulación de bacteriófagos

La encapsulación se puede definir como un proceso de atrapamiento de una sustancia (agente activo) dentro de otra (material portador), cuyo principal objetivo es proporcionar a la sustancia encapsulada una protección efectiva frente a factores externos (Nedovic, Kalusevic, Manojlovic, Levic, & Bugarski, 2011). La encapsulación es una estrategia de conservación y, a la vez, una técnica para obtener diferentes formulaciones. Existen varias técnicas de encapsulación que se han aplicado en la formulación de bacteriófagos, tal y como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Técnicas de encapsulación aplicadas a bacteriófagos.

Tipo de proceso	Método	Morfología
	Liofilización	 <p>Bacteriófago</p> <p>Matriz</p>
Físico-mecánico	Secado por pulverización	 <p>Bacteriófago</p> <p>Matriz</p>
	Extrusión	 <p>Bacteriófago</p> <p>Fase acuosa</p> <p>Ca-Alginato</p>
Químico	Emulsificación simple	 <p>Bacteriófago</p> <p>Fase orgánica</p> <p>Fase acuosa</p>
	Emulsificación doble	 <p>Bacteriófago</p> <p>Fase orgánica</p> <p>Fase acuosa (A₁)</p> <p>Fase acuosa (A₂)</p>
Físico-Químico	Atrapamiento en vesículas	 <p>Bacteriófago</p> <p>Surfactante</p> <p>Fosfolipido</p>

1.4.2.1 Liofilización

La liofilización, también conocida como secado por congelación (*freeze drying*), es un proceso utilizado para la deshidratación de casi todos los materiales sensibles al calor. Se desarrolla en dos pasos, en primer lugar se congela el material y, a continuación, se reduce la presión circundante y se agrega el calor necesario para permitir que el agua congelada en el material se sublime directamente de la fase sólida a la fase gaseosa (Oetjen & Haseley, 2004). Excepto por el largo período de deshidratación requerido (generalmente 20 h), la liofilización es una técnica simple que se ha utilizado habitualmente en la industria farmacéutica para la encapsulación de los medicamentos (Emami, Vatanara, Park, & Na, 2018). La liofilización y su posterior almacenamiento en presencia de aditivos estabilizantes o lioprotectores, tales como leche descremada, disacáridos, glicerol o PEG, ha mejorado la viabilidad de diferentes bacteriófagos (Merabishvili et al., 2013). Otros agentes crioprotectores como la hidroxipropilmetilcelulosa (2%) y el manitol (1%) se han utilizado en la obtención de un polvo inhalable que contenía fagos para su administración nasal (Alfadhel, Puapermpoonsiri, Ford, McInnes, & Van Der Walle, 2011).

1.4.2.2 Secado por pulverización

El secado por pulverización (*spray drying*) es el método de deshidratación más común para obtener un polvo seco (partículas sólidas) en aplicaciones farmacéuticas. El proceso comprende atomización, secado y separación de partículas. La solución con el compuesto de interés se pulveriza a través de boquillas en una cámara de secado en la que se produce una corriente de gas caliente, que evapora y elimina el solvente (Figura 4). La formación de gotitas genera una gran superficie específica que determina un secado casi instantáneo (de unos pocos milisegundos a segundos). Las partículas sólidas recién formadas se separan de esta corriente de aire utilizando un ciclón (Emami et al., 2018). Resulta por tanto una técnica adecuada para producir polvos de biomateriales sensibles al calor, como proteínas, péptidos o bacteriófagos.

Debido a la rápida evaporación, el secado por pulverización a menudo produce partículas amorfas, morfología preferida para las formulaciones de proteínas, ya que mejoran su estabilidad. Para mantener este estado y evitar la transformación al estado cristalino, es necesario controlar factores como la temperatura y la humedad durante el almacenamiento (Emami et al., 2018; Vandenneuvel, Meeus, Lavigne, & Van den Mooter, 2014). Las sustancias secadas por pulverización pueden volver a disolverse con facilidad para su aplicación, pero también son aptas para ser procesadas en otras formulaciones de dosificación, tales como pastillas y polvos inhalables (Vandenneuvel et al., 2015).

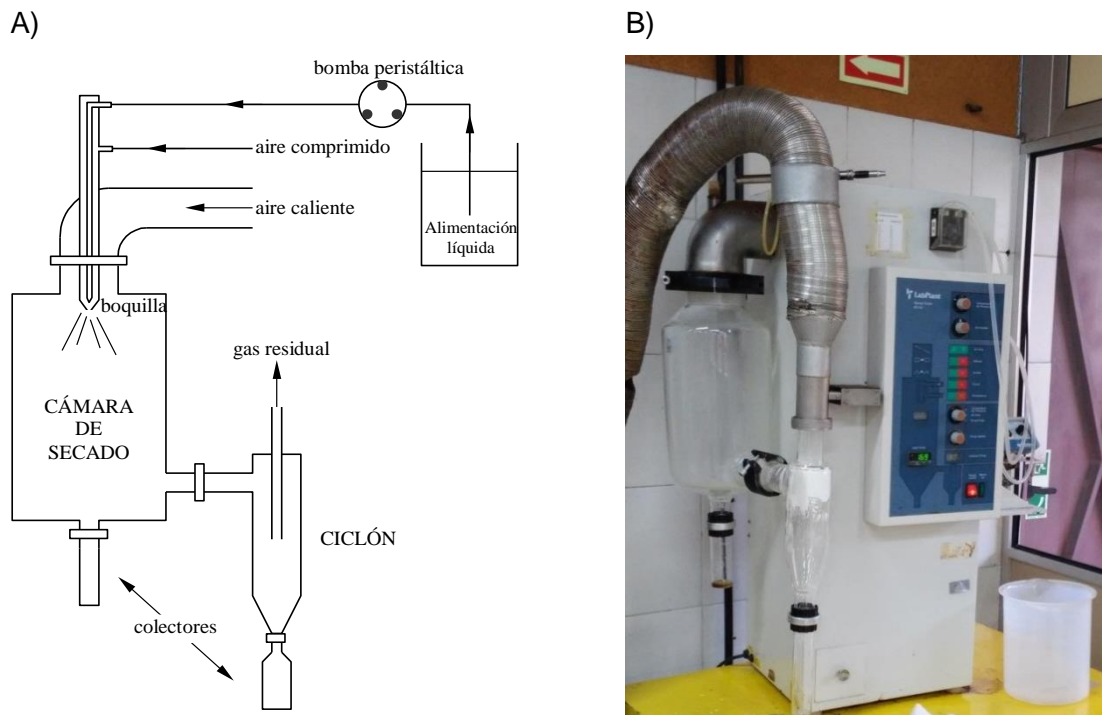


Figura 4. Equipo de secado por pulverización a escala de laboratorio utilizado en este estudio. A) Esquema gráfico. B) Fotografía del equipo.

Los principales inconvenientes del secado por pulverización incluyen: un bajo rendimiento y mayor contenido de humedad residual en comparación con la liofilización, altas fuerzas cohesivas entre las partículas secas y posibles tensiones generadas en las proteínas durante el proceso (Ameri & Maa, 2006). Las principales fuentes de estrés que actúan sobre las proteínas son el esfuerzo térmico y cortante. La deshidratación en contacto con el aire caliente, así como la exposición a la interfaz aire-líquido en la superficie de la gota durante la atomización pueden causar degradación (Emami et al., 2018). No obstante, rara vez se produce la degradación por estrés térmico en este proceso, ya que la mayor parte de la energía térmica se utiliza para evaporar el disolvente, y las gotas pulverizadas se mantienen a una temperatura significativamente más baja del bulbo húmedo (Maltesen & Van De Weert, 2008). Además, el uso de aditivos estabilizadores puede proporcionar un escudo protector y evitar la exposición a la superficie interfacial o atmósfera caliente (Emami et al., 2018).

La adición de aditivos protectores, tales como disacáridos (trehalosa, sacarosa, lactosa), polisacáridos (maltodextrina o dextrano) o proteínas (la leche descremada), puede estabilizar los fagos durante la deshidratación, mejorando su viabilidad durante el proceso de secado. Su efecto protector depende del tipo y la concentración de los aditivos utilizados (Wang & Sabour, 2010). Habitualmente, se añade leucina a las formulaciones para mejorar

Introducción

las dispersión del polvo obtenido, ya que reduce las fuerzas cohesivas entre partículas (Matinkhoo, Lynch, Dennis, Finlay, & Vehring, 2011)

1.4.2.3 Extrusión

La extrusión o método de gotas es la técnica más antigua y habitual para la formación de cápsulas y el material de soporte utilizado es el alginato. Consiste en mezclar una suspensión que contenga el microorganismo de interés con una solución de alginato de sodio (1–2%). A continuación, la mezcla se gotea a través de una aguja de jeringa, de manera que las gotas caen libremente en una solución que contiene un catión multivalente (generalmente Ca^{2+} en forma de CaCl_2 (0.05–1.5 M)). Las gotitas forman esferas de gel de forma instantánea, y los microorganismos quedan atrapados en una estructura tridimensional reticulada de alginato de calcio. El tamaño de las cápsulas es de milímetros (microcápsulas) y depende del diámetro de la aguja y la distancia de caída libre (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2003).

La extrusión es una técnica utilizada habitualmente en la industria alimentaria, en la que la formación de microcápsulas de una solución hidrocoloide mejora la viabilidad, por ejemplo, de las bacterias probióticas durante su paso por el tracto gastrointestinal. Las propiedades de una solución hidrocoloide permiten generar una capa alrededor de un agente bioactivo (ej. una célula bacteriana), lo que proporciona protección frente a las condiciones del entorno. En comparación con otras técnicas utilizadas en la formación de cápsulas, como la emulsificación, la extrusión es mucho más fácil de realizar y tiene muchas ventajas: simplicidad, bajo coste, flexibilidad y condiciones suaves de formulación que aseguran una gran retención de microorganismos viables (Choińska-Pulit, Mituła, Śliwka, Łaba, & Skaradzińska, 2015; Krasaekoopt et al., 2003).

1.4.2.4 Emulsificación

Esta técnica de encapsulación consiste en agregar un pequeño volumen de una disolución con el compuesto de interés y un polímero (fase discontinua) a un gran volumen de un aceite vegetal (fase continua), que puede ser aceite de soja, girasol, canola o maíz. La mezcla se homogeneiza mediante una agitación adecuada hasta que el agua en el aceite forma una emulsión simple (W/O). Posteriormente se añaden emulsionantes para estabilizar la emulsión, de manera que el polímero soluble en agua insolubiliza, formando pequeñas capsulas dentro de la fase oleosa, en cuyo interior se encuentra el compuesto encapsulado. El tamaño de las cápsulas puede ir desde los 2 mm hasta los 25 mm, dependiendo de la velocidad de agitación (Krasaekoopt et al., 2003).

Las emulsiones dobles son un sistema ternario, en el que se dispersan gotas que a su vez contiene pequeñas gotas de una fase diferente, por lo que pueden ser de dos tipos: agua-aceite-agua ($W_1/O/W_2$) o aceite-agua-aceite ($O_1/W/O_2$) (Aserin, 2008). Para formular una emulsión doble del tipo $W_1/O/W_2$, se prepara la denominada emulsión primaria simple (W_2/O), añadiendo un emulsionante de tipo lipofílico y a continuación, se añade una segunda fase acuosa (W_1) y un emulsionante de tipo hidrofílico para crear la emulsión doble ($W_1/O/W_2$).

La emulsificación se ha usado para encapsular bacteriófagos destinados a administración tópica, oral o por inhalación, comprobándose su estabilidad y viabilidad tras el proceso de encapsulación en emulsiones simples (Esteban et al., 2014) y dobles (Choińska-Pulit et al., 2015).

1.4.2.5 Atrapamiento en vesículas

Las vesículas son partículas coloidales en las que una bicapa concéntrica formada por moléculas anfifílicas rodea un compartimento acuoso. Son un vehículo útil para el suministro de fármacos, tanto de aquellos que son hidrófobos que se asocian con la bicapa lipídica, como de los hidrófilos, que están encapsulados en el compartimento acuoso interior. Esta versatilidad justifica el interés por estos sistemas vesiculares, como liposomas, niosomas, transferosomas, farmacosomas y etosomas, como alternativa para mejorar la administración de medicamentos (Kumar & Rajeshwarrao, 2011; Rajera, Nagpal, Singh, & Mishra, 2011).

Las vesículas compuestas por fosfolípidos naturales o sintéticos se denominan liposomas. A los sistemas liposomales modificados, que además de los fosfolípidos, contienen un tensioactivo de cadena única como activador de borde, se les conoce como transferosomas y aquellas vesículas en las que los fosfolípidos han sido sustituidos en su totalidad por tensioactivos no iónicos se conocen como niosomas (Kumar & Rajeshwarrao, 2011; Uchegbu & Vyas, 1998). Por otro lado, los etosomas son sistemas vesiculares formado por fosfolípidos que incorporan etanol en concentraciones relativamente altas, lo que mejora su penetración en la piel (Touitou, Dayan, Bergelson, Godin, & Eliaz, 2000), mientras que los farmacosomas son un novedoso sistema de administración de fármacos, los cuales se incorporan en la dispersión coloidal, unidos covalentemente a los fosfolípidos (Pandita & Sharma, 2013).

Los liposomas presentan problemas debido a su baja estabilidad física y química cuando se encuentran en suspensiones acuosas, debido a las dos posibles vías de

Introducción

degradación de los fosfolípidos: oxidativa o hidrolítica (Grit & Crommelin, 1993). Por esta razón, han comenzado a estudiarse otras vesículas (como los niosomas y transferosomas) que contienen otras moléculas anfífilas, como son los tensioactivos. Una de las principales ventajas es que los tensioactivos se derivatizan fácilmente, dan una mayor versatilidad a la estructura vesicular y, además, tienen un menor coste comparados con los fosfolípidos (Marianecci et al., 2014). Los niosomas y transferosomas, son similares a los liposomas en términos de estructura y propiedades físicas, tal y como se muestra en la Figura 5.

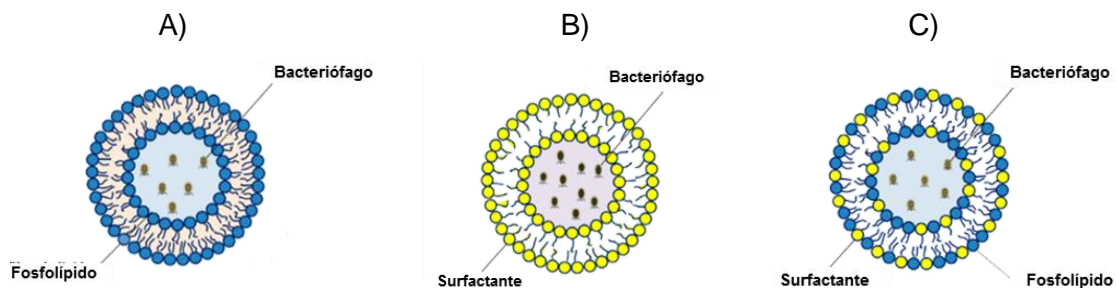


Figura 5. Esquema mostrando la estructura de diferentes vesículas. A) Liposomas. B) Niosomas. C) Transferosomas.

Para la encapsulación de bacteriófagos y otros compuestos en vesículas, se utiliza habitualmente el método de hidratación de película fina o “Thin film hydration (TFH)” (Bangham, Standish, & Watkins, 1965), en el que los componentes de la vesícula se disuelven en un disolvente orgánico (cloroformo) que posteriormente, se evapora en un rotavapor creando una película fina. Dicha película se rehidrata con una disolución acuosa que contiene el bacteriófago y la formación de las vesículas tiene lugar tras una homogeneización por agitación (Malik et al., 2017).

Con respecto al uso de liposomas merece la pena destacar que ya se han realizado estudios con resultados positivos en relación a la encapsulación de fagos y el efecto protector que pueden ofrecer estas vesículas, para su aplicación en terapia fágica, cuando son suministrados oralmente o localmente o en biocontrol alimentario. Un ejemplo en terapia de fagos es la encapsulación de un fago de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium en liposomas catiónicos (200–800 nm). Estos ofrecieron al fago una protección frente a los ácidos gástricos de las aves y favorecieron, al mismo tiempo, su adhesión a mucosas debido a sus superficies cargadas positivamente, lo que prolongaría su tiempo de residencia intestinal (Colom et al., 2015).

2 El género *Staphylococcus*

2.1 Características generales

El género *Staphylococcus* comprende bacterias con forma de cocos, Gram positivas, de 0,5-1,5 μm de diámetro, inmóviles, no esporuladas que se dividen en diversos planos, dando lugar a grupos irregulares de racimos, aunque también pueden presentarse individualmente, en parejas, en tétradas o formando cadenas cortas. Atendiendo a su metabolismo, la mayoría de los estafilococos son oxidasa negativos y catalasa positivos; esta última característica se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos. Al mismo tiempo, su capacidad para crecer en ausencia de oxígeno (anaerobios facultativos) permite diferenciarlos del género *Micrococcus*. La mayoría de las especies son poco exigentes en cuanto a requerimientos nutricionales, crecen entre los 18°C y los 40°C (mesófilos) y en presencia de NaCl 10% (halotolerantes), y muestran alta resistencia al calor (Schleifer & Bell, 2009).

La 2ª edición del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Schleifer & Bell, 2009) incluye el género *Staphylococcus* en el phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Bacillales* y familia *Staphylococcaceae*. A dicho género pertenecen 53 especies y 28 subespecies según la base de datos “List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature” (LPSN) (Parte, 2018).

Las especies que se asocian con más frecuencia a enfermedades en humanos son *S. aureus* (Lowy, 1998) y *Staphylococcus epidermidis* (Otto, 2014). Ambas especies son microorganismos comensales del hombre y otros animales con capacidad para colonizar ambientes muy dispares (alimentos o superficies). Suponen por tanto un riesgo para la salud, debido a su presencia en la industria alimentaria (Gutiérrez et al., 2012) e instalaciones sanitarias (Hischebeth et al., 2019; Wojtyczka et al., 2014). Además, generan importantes pérdidas económicas en la industria agroalimentaria cuando infectan a animales de granja (Sampimon, Lam, Mevius, Schukken, & Zadoks, 2011).

2.2 Patogenicidad de *S. aureus* y *S. epidermidis*

Como se mencionó anteriormente, los seres humanos y algunas especies animales son un reservorio natural de *S. aureus*. Esta bacteria se encuentra principalmente en las fosas nasales, pero también en otras partes del cuerpo como la piel, las axilas, la faringe o el periné. Las tasas de colonización entre adultos sanos (asintomáticos) varían según se hable de portadores permanentes (10%-35%), de portadores intermitentes (20%-75%) y de no portadores (5%-70%) (Lowy, 1998; Vandenberg & Verbrugh, 1999).

A pesar de ser un habitante habitual de nuestro cuerpo, *S. aureus* es además un patógeno oportunista en el ser humano. De hecho, este microorganismo es uno de los patógenos más versátiles y peligrosos tanto en el ámbito clínico como en el agroalimentario, capaz de aprovechar situaciones en las que el hospedador presenta el sistema inmune deprimido y/o se produce una rotura en la barrera de protección de las mucosas, para invadir los tejidos o el torrente sanguíneo. Así, *S. aureus* puede dar lugar a infecciones de la piel, del tracto respiratorio, endocarditis, osteomielitis, septicemias e incluso la muerte (Lowy, 1998).

Como patógeno alimentario, *S. aureus* es la principal causa de intoxicaciones producidas por la ingestión de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) preformadas por esta bacteria en una amplia variedad de alimentos: carne, huevos, pasteles rellenos de crema, patatas, arroz, ensaladas o la leche y sus derivados, etc. (Doyle, Hartmann, & Lee Wong, 2012). Produce también mastitis crónicas en ganado vacuno, bovino y caprino, provocando la contaminación de la leche y los productos que de ella se obtienen (Fluit, 2012; Peton & Le Loir, 2014).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) documentaron que en 2018 fueron notificadas un total de 114 intoxicaciones alimentarias causadas por toxinas bacterianas producidas por *S. aureus* (EFSA and ECDC, 2019). Por otro lado, los últimos datos proporcionados por los Centros para la Prevención y Control de Enfermedades estadounidenses (CDC) presentan un total de 559 personas enfermas y 56 hospitalizaciones causadas por toxinas de *S. aureus* en los Estados Unidos (CDC, 2017).

Además, esta bacteria es una de las principales causas de infecciones nosocomiales junto con *S. epidermidis*. En Europa, entre los años 2016-2017, un 12,3% de las infecciones nosocomiales fueron producidas por *S. aureus* (Plachouras et al., 2018). En

el caso de *S. epidermidis* los últimos datos indicaban una incidencia del 3,4% (ECDC, 2013).

Por su parte, *S. epidermidis* es un microorganismo permanente de la microbiota humana normal y se localiza principalmente en la piel, pero también en mucosas y tejidos húmedos como las fosas nasales (Grice et al., 2009). En individuos sanos, *S. epidermidis* ejerce un papel beneficioso, al modular el sistema inmunológico y, al mismo tiempo, comprometiendo la viabilidad o la capacidad de colonización de otros microorganismos patógenos tales como *S. aureus* (Iwase et al., 2010).

No obstante, se ha observado que *S. epidermidis* se comporta como patógeno oportunista, causando infecciones invasivas en neonatos prematuros (Dong & Speer, 2014), individuos inmunocomprometidos (Weisser et al., 2010) y en pacientes con dispositivos médicos implantados. De hecho, *S. epidermidis* causa aproximadamente el 20% de todas las infecciones nosocomiales relacionadas con dispositivos ortopédicos (Orthopedic-device-related infections, ODRI) (Montanaro, Speziale, et al., 2011a), llegando al 50% cuando nos referimos a infecciones de desarrollo tardío, es decir, aquellas que se presentan meses después de la cirugía (Schäfer et al., 2008). La mayoría de las infecciones se asocian a la capacidad de esta bacteria de formar biofilms (Otto, 2009), complicando los protocolos de tratamiento médico y quirúrgico, siendo necesario frecuentemente extraer el implante, para eliminar el biofilm, y su posterior re inserción (Vuong & Otto, 2002). *S. epidermidis* también puede causar peritonitis, infecciones superficiales en la piel, endoftalmitis y mastitis (Rupp, 2014).

2.2.1 Factores de virulencia

S. aureus es un patógeno muy versátil y más agresivo que *S. epidermidis*, debido a que posee un amplio arsenal de factores de virulencia que se pueden dividir en factores asociados a la superficie celular y factores secretados (exotoxinas y exoenzimas). Todos ellos participan en la patogénesis de la infección, permitiendo su adhesión a superficies y tejidos, y evitando o inactivando el sistema inmunológico (Tabla 3) (Foster, 2005; Lowy, 1998).

En el caso de *S. epidermidis*, el número de factores de virulencia es limitado y su capacidad para producir infecciones invasivas, y en particular las relacionadas con las ODRI, se reduce a la utilización de los mismos mecanismos que le permiten persistir en la piel humana y los tejidos de la mucosa:

Introducción

- Producción de toxinas: *S. epidermidis* tiene la capacidad de producir PSM δ , una potente toxina leucolítica, pero su producción es baja, lo que explica su baja potencia citolítica (Cheung et al., 2010).
- Adhesinas: permiten la adhesión de *S. epidermidis* a la superficie del dispositivo implantado o a las proteínas plasmáticas del hospedador que lo recubren, entre las que destacan: proteínas de superficie estafilocócica 1 y 2 (SSP-1, SSP-2), adhesinas para la vitronectina (Autolisina AtlE y adhesina Aae), el fibrinógeno (SdrG/Fbe), el colágeno (SdrF/GehD) y la elastina (EbpS) (Sabaté Brescó et al., 2017).

Tabla 3. Factores de virulencia de *S. aureus*.

CLASIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Asociados a la superficie celular	<p><u>MSCRAMM</u>: componentes de la superficie microbiana que reconocen las moléculas de la matriz adhesiva (biofilms):</p> <ul style="list-style-type: none"> – Proteína A (SpA) y proteínas del factor de agregación (ClfA y ClfB): evitan la opsonización y fagocitosis. – Proteínas de unión a la fibronectina (FnbpA y FnbpB) y al colágeno (Cna): promueven la unión a coágulos de sangre, tejido traumatizado y cartílago. <p>Cápsula polisacáridica: reduce la fagocitosis por neutrófilos. Peptidoglicano: actúa como estabilizador osmótico y estimula la quimiotaxis de los neutrófilos, produciendo abscesos. Ácidos teicoicos: participan en la adherencia a la superficie de las mucosas. Estafiloxantina: protección frente al estrés oxidativo y la fagocitosis.</p>
Exoenzimas	<p>Destruyen el tejido facilitando la propagación de la infección a los tejidos adyacentes: coagulasas, hialuronidasas, fibrinolisin, lipasas, endonucleasas/DNasas y proteasas</p>
Exotoxinas	<p>Citotoxinas: la mayoría forman poros en la membrana celular de las células del hospedador, produciendo su lisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Hemolisinas α, β, γ y δ – Leucocidina de Panton–Valentine <p>Toxinas exfoliativas: (ETA, ETB, ETD): causan eritema y separación de la piel (síndrome de la piel escaldada estafilocócica).</p> <p>Superantígenos: proliferación de células T y liberación de citoquinas:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Enterotoxinas (A, B, C y D), causa de intoxicación alimentaria. – TSST-1: causa del síndrome del <i>shock</i> tóxico.

2.2.2 Formación de biofilms o biopelículas

Los biofilms o biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz y adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo (Costerton, Lewandowski, Caldwell, Korber, & Lappin-Scott, 1995), cuyo proceso de formación se divide en tres fases. En primer lugar se produce la adherencia de las bacterias a la superficie; le sigue una fase de maduración en la que las células proliferan, secretando componentes que constituirán la matriz del biofilm, y en la última fase, se dan fenómenos de desprendimiento (Figura 6) (Arciola, Campoccia, Speziale, Montanaro, & Costerton, 2012; Otto, 2008).

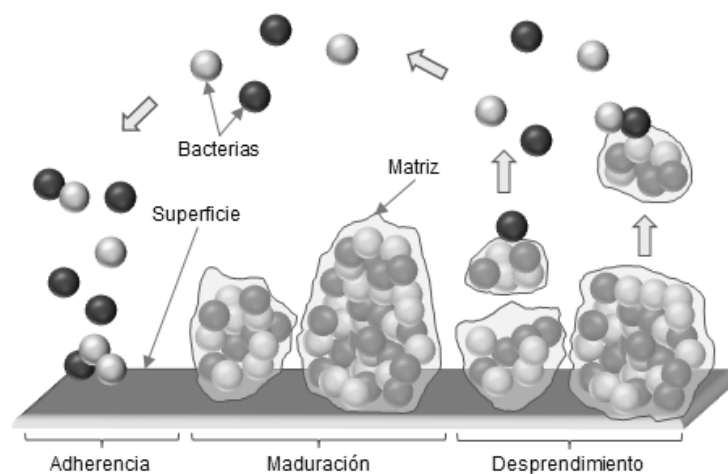


Figura 6. Proceso de formación de un biofilm indicando las principales fases de desarrollo. [Adaptación de (Otto, 2008)]

S. aureus y *S. epidermidis* causan de forma frecuente y recurrente infecciones asociadas a la formación de biofilms, sobre todo en el ambiente hospitalario (Hall-Stoodley, Costerton, & Stoodley, 2004). Las biopelículas confieren resistencia a la bacteria frente a antibióticos (Singh et al., 2010) y a los mecanismos de defensa del hospedador (Arciola et al., 2012). También se ha evidenciado la capacidad de *S. aureus* para formar biopelículas en matrices alimentarias y superficies comunes en la industria alimentaria, como el acero inoxidable y la dificultad para la eliminación de estas biopelículas, que presentan una mayor resistencia a los desinfectantes (Galié, García-Gutiérrez, Miguélez, Villar, & Lombó, 2018).

2.2.3 Resistencia a los antibióticos

Los estafilococos resistentes a los antibióticos son un problema global que afecta tanto al sector clínico y veterinario como al agroalimentario (Lowy, 2003; Becker, Heilmann, & Peters, 2014). De hecho, estas especies adquieren rápidamente genes de resistencia a

Introducción

antibióticos por transferencia horizontal, y además, dicha resistencia puede ser fácilmente transferida de una especie a la otra (Wielders et al., 2001).

Desde el descubrimiento y comercialización de los antibióticos en los años 40, se han ido sucediendo la aparición de resistencias a medida que se iban desarrollando e introduciendo nuevos antibióticos (Figura 7). Por ejemplo, la resistencia a la penicilina mediada por β -lactamasas en cepas de *S. aureus* fue detectada en 1946, y en 1960 se aislaron cepas de *S. aureus* con resistencia a la metilina (MRSA, por sus siglas en inglés) (Lakhundi & Zhang, 2018). La resistencia a la metilina en *S. aureus* (MRSA) y *S. epidermidis* (MRSE) está mediada por el gen *mecA*, que se encuentra localizado en el operón SCCmec (Garza-González, Morfín-Otero, Llaca-Díaz, & Rodríguez-Noriega, 2010). Desde entonces, se ha diseminado rápidamente en hospitales de todo el mundo, alcanzando en la actualidad proporciones epidémicas en algunos países (Boucher & Corey, 2008), lo que, junto a la aparición de clones de MRSA adquiridos en la comunidad (CA-MRSA, por sus siglas en inglés) y los asociados al ganado (LA-MRSA, por sus siglas en inglés) (Lakhundi & Zhang, 2018), ha generado un importante impacto en los sistemas de salud (Doyle et al., 2012).

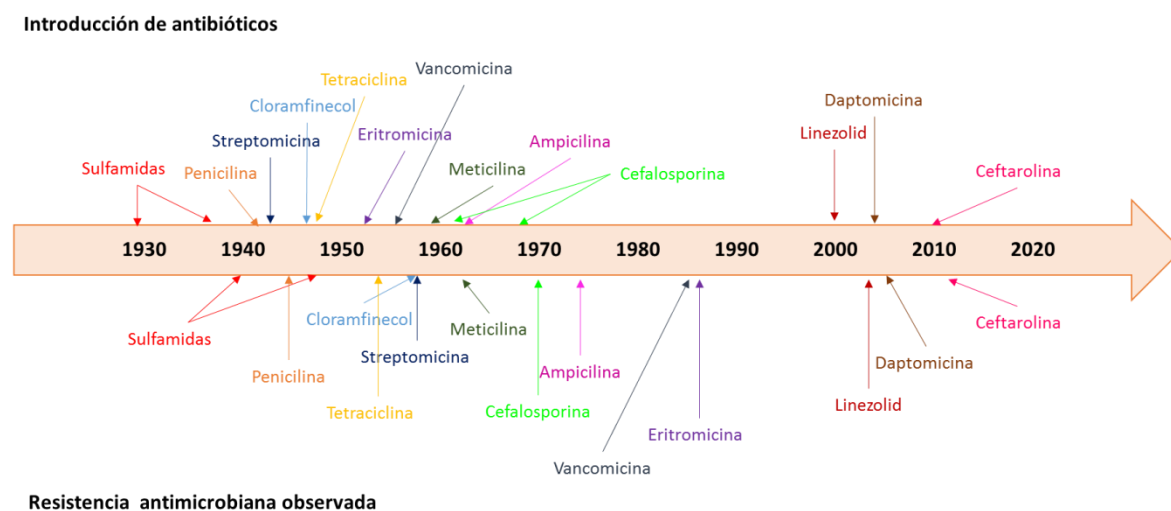


Figura 7. Evolución temporal de la resistencia a antibióticos [Adaptación de Clatworthy, Pierson, & Hung, (2007); <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>]

Tratando de solventar el problema de la resistencia, se han desarrollado nuevos antibióticos para el tratamiento de infecciones causadas por MRSA, pero desafortunadamente la eficacia de estos compuestos va en disminución, habiéndose descrito resistencias también a los antibióticos de última generación como el linezolid y la daptomicina (Chatterjee & Otto, 2013).

Ante la elevada frecuencia de infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos, resulta necesario el desarrollo de nuevas terapias en las que se cuente con agentes antimicrobianos alternativos que, además, sean eficaces para eliminar biofilms, tanto en el ámbito clínico como en el agroalimentario. Estudios recientes indican que los bacteriófagos podrían ser una alternativa factible para este fin (Harada et al., 2018; O'Sullivan, Bolton, McAuliffe, & Coffey, 2019).

Antecedentes y Objetivos

En los últimos años se ha observado un preocupante incremento de bacterias patógenas que acumulan múltiples resistencias a antibióticos. Esto ha propiciado la búsqueda de sistemas alternativos para la eliminación de estas bacterias, sobre todo de aquellas que ocasionan graves enfermedades infecciosas. Así, ha resurgido el interés por el uso de los bacteriófagos y se ha potenciado el estudio de proteínas derivadas de los mismos, como agentes antimicrobianos para su aplicación en terapia fágica y en biocontrol.

En el laboratorio disponemos de una colección representativa de cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* aisladas tanto del ambiente alimentario como del ámbito clínico, frente a las que hemos aislado y caracterizado en profundidad cuatro bacteriófagos. Dos de ellos pertenecen a la familia *Siphoviridae* (vB_SauS-philPLA35, vB_SauS-philPLA88), son dos fagos virulentos obtenidos por delección aleatoria de ADN a partir de dos fagos atemperados aislados de leche, Φ H5 y Φ A72 (García, Madera, Martínez, & Rodríguez, 2007). Ensayos previos nos han permitido comprobar la eficacia de estos fagos en la eliminación de la bacteria patógena *S. aureus* tanto en cultivos en crecimiento como en diversas matrices alimentarias (leche, cuajada, queso) (Bueno, García, Martínez, & Rodríguez, 2012; García, Madera, Martínez, Rodríguez, & Suárez, 2009; García et al., 2007; Obeso et al., 2010). Otros dos bacteriófagos (vB_SauM-philPLA-RODI y vB_SepM-philPLA-C1C) pertenecen a la familia *Myoviridae*, y son fagos virulentos que poseen un amplio rango de hospedador, infectando un gran número de cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* (Gutiérrez et al., 2015).

Además de la posible aplicación de los bacteriófagos como bioconservantes alimentarios, es de gran interés para la industria alimentaria la aplicación de los mismos como desinfectantes. En ensayos de laboratorio hemos comprobado la eficacia de estos fagos para la eliminación de biofilms formados por *S. aureus* y *S. epidermidis* sobre distintas superficies (Gutiérrez et al., 2015).

Los resultados satisfactorios obtenidos en investigaciones previamente realizadas han permitido que actualmente se comercialicen varios productos antimicrobianos basados en bacteriófagos. Sin embargo, la posibilidad de poner en el mercado nuevos productos depende fundamentalmente de que se puedan producir a gran escala de forma segura y que su producción sea rentable. Para ello, se requiere la optimización de los procesos de propagación y el diseño de formulaciones adecuadas que permitan su almacenamiento y garanticen su viabilidad hasta el momento de su aplicación.

Antecedentes y Objetivos

El objetivo global de este proyecto de Tesis Doctoral fue la optimización de los procesos de propagación, formulación y almacenamiento de estos fagos con vistas a una futura producción y aplicación industrial de los mismos. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos:

Objetivo 1.-Optimización a pequeña escala de la propagación del fago philPLA-RODI. Con objeto de obtener el mayor rendimiento posible (nº de fagos/volumen de cultivo) de una forma segura, se modificaron varios parámetros (cepa hospedadora, concentración de bacteria y título fágico inicial, agitación y temperatura de incubación) en los procesos de infección de los cultivos a escala de laboratorio, utilizando como hospedador una especie bacteriana no patógena.

Objetivo 2. Formulación y almacenamiento de fagos. Se estudió la estabilidad de cuatro fagos (philPLA35, philPLA88, philPLA-RODI, philPLA-C1C) bajo cinco condiciones de almacenamiento: refrigeración, congelación (-20°C, -80°C, -196°C), liofilización, encapsulación con alginato y secado por pulverización, en presencia de varios agentes conservantes.

Objetivo 3. Determinación de la estabilidad de philPLA-RODI frente a factores ambientales. Se diseñaron formulaciones adecuadas para mejorar la estabilidad del fago en diferentes tipos de nanovesículas, frente a factores como temperatura, pH, y presencia de sales. Además, se estudió la existencia de interacciones sinérgicas o antagónicas entre philPLA-RODI y varios desinfectantes, que podrían afectar a la eficacia de los mismos para eliminar bacterias patógenas.

1 Optimización de la propagación del bacteriófago vB_SauM-philPLA-RODI que infecta a *S. aureus*, utilizando la metodología de superficie de respuesta

El uso de fagos como antimicrobianos en ámbitos como el clínico y el alimentario requiere su producción a gran escala y, por tanto, una propagación eficiente y reproducible. Por ello, el primer objetivo de esta Tesis doctoral fue optimizar la propagación del fago philPLA-RODI que infecta a *S. aureus* a escala de laboratorio. Inicialmente, se buscó un hospedador no patógeno alternativo para reducir el riesgo de manejar grandes cantidades de bacteria patógena. Posteriormente, se comprobó que el bacteriófago philPLA-RODI mantenía el mismo rango de hospedador e infectividad, independientemente de la especie estafilocócica utilizada para su propagación. Finalmente, se determinaron las condiciones óptimas de propagación (temperatura, agitación, concentración bacteriana y título fágico inicial), para obtener el máximo rendimiento en el título final. En este trabajo, se hizo uso de la metodología de superficie de respuesta (MSR), que permite el análisis de la relación entre un conjunto de factores experimentales controlables y los resultados observados de la variable de interés (respuesta) para posteriormente, optimizar dicha respuesta.


Artículo 1. González-Menéndez, E., Arroyo-López, F.N., Martínez, B., García P., Garrido-Fernández, A. & Rodríguez, A. (2018). Optimizing Propagation of *Staphylococcus aureus* Infecting Bacteriophage vB_SauM-philPLA-RODI on *Staphylococcus xylosus* Using Response Surface Methodology. *Viruses*, 10(4), 153. <https://doi.org/10.3390/v10040153>

Contribución personal al trabajo

- Concepción y diseño de los experimentos, junto con el resto de co-autores.
- Experimentación en su totalidad.
- Análisis de los datos, junto con Francisco Noé Arroyo-López, Antonio Garrido-Fernández y Ana Rodríguez.
- Redacción del manuscrito y elaboración de tablas y figuras, junto con el resto de co-autores del artículo.

Article

Optimizing Propagation of *Staphylococcus aureus* Infecting Bacteriophage vB_SauM-phiIPLA-RODI on *Staphylococcus xylosus* Using Response Surface Methodology

Eva González-Menéndez ¹, Francisco Noé Arroyo-López ², Beatriz Martínez ¹ , Pilar García ¹, Antonio Garrido-Fernández ² and Ana Rodríguez ^{1,*}

¹ Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Spain; eva.gm@ipla.csic.es (E.G.-M.); bmf1@ipla.csic.es (B.M.); pgarcia@ipla.csic.es (P.G.)

² Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Campus Universitario Pablo de Olavide, Edificio 46. Ctra, Sevilla-Utrera, 1 km, 41013 Sevilla, Spain; fnoe@ig.csic.es (F.N.A.-L.); garfer@cica.es (A.G.-F.)

* Correspondence: anarguez@ipla.csic.es; Tel.: +34-985-89-21-31 (ext. 24)

Received: 23 February 2018; Accepted: 26 March 2018; Published: 27 March 2018



Abstract: The use of bacteriophages for killing pathogenic bacteria is a feasible alternative to antibiotics and disinfectants. To obtain the large quantities of phages required for this application, large-scale production of bacteriophages must be optimized. This study aims to define conditions that maximize the phage yield of the virulent and polyvalent staphylococcal bacteriophage vB_SauM-phiIPLA-RODI in broth culture, using the food-grade species *Staphylococcus xylosus* as the host strain to reduce the risk of growing massive quantities of pathogenic bacteria and therefore, to ensure the safety of the final phage stock. The effect of four variables, namely initial bacterial concentration (5.66–8.40 log₁₀ colony-forming unit (CFU)/mL), initial phage concentration (5–8 log₁₀ plaque-forming unit (PFU)/mL), temperature (21–40 °C) and agitation (20–250 rpm), on phage yield (response) was studied by using response surface methodology (RSM). Successive experimental designs showed that agitation did not significantly impact phage yield, while temperature did have a significant effect, with 38 °C being the optimum for phage propagation. The results allowed the design of a model to describe phage yield as a function of the initial bacterial and phage concentrations at fixed agitation (135 rpm), and optimum temperature (38 °C). The maximum experimental phage yield obtained was 9.3 log₁₀ PFU/mL, while that predicted by the model under the optimized conditions (7.07 log₁₀ CFU/mL initial bacterial population and 6.00 log₁₀ PFU/mL initial phage titer) was 9.25 ± 0.30 log₁₀ PFU/mL, with the desirability of 0.96. This yield is comparable to that obtained when the phage was propagated on the original host, *Staphylococcus aureus*. Bacteriophage phiIPLA-RODI showed the same host range and very similar biofilm removal ability regardless of the staphylococcal species used for its propagation. The results presented in this study show the suitability of using a food-grade strain of *S. xylosus* for the propagation of *S. aureus* infecting phages and the application of RSM to define the optimal propagation conditions.

Keywords: bacteriophages; food safety; propagation; optimization; Response Surface Methodology; *Staphylococcus*

1. Introduction

Staphylococcal food poisoning is one of the most common food-borne diseases worldwide that results from the ingestion of pre-formed enterotoxins produced by *Staphylococcus aureus* [1]. The European Food Safety Authority (EFSA) reported in 2015 a total of 434 food-borne outbreaks

caused by staphylococcal toxins [2]. In the United States, 352 outbreak-associated illnesses and 27 hospitalizations were caused by *S. aureus* toxins in 2016 [3]. The pathogenicity of this bacterium is due to a combination of toxin-mediated virulence, invasiveness and antibiotic resistance [4]. Indeed, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is one of the leading causes of hospital-acquired infections.

It is also remarkable the increase in infections caused by multidrug-resistant *S. aureus* and community-associated methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) as it results in a diminished effectiveness of the antibiotic treatment [5]. For instance, many methicillin-resistant strains of *S. aureus* (MRSA) show a decreased susceptibility to glycopeptides such as vancomycin [6–8]. An interesting survey addressed by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) in the period 2011–2012 showed a 41% of invasive *S. aureus* isolates carrying methicillin resistance [9].

Since multidrug resistance is rapidly evolving in several species including *S. aureus* [10], there is a clear need for novel approaches to circumvent this problem. Bacteriophages have been proposed as a suitable antimicrobial alternative to the use of antibiotics, as they are natural enemies of bacteria [11,12]. Currently, there is a renaissance of phage therapy studies in western countries, and the results from clinical trials in animals are confirming the efficacy of phages as therapeutics. Despite the regulatory hurdles, several biotechnological companies are assaying bacteriophages in human clinical trials to promote their future commercialization (reviewed by [13]). Bacteriophages are also suitable to control pathogenic bacteria along the food chain [14]. Several studies have demonstrated their effectiveness in controlling bacterial pathogens in agro-food industry, such as *Salmonella*, *S. aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Listeria monocytogenes* [15]. Usefulness of bacteriophages in food safety includes their application as disinfectants to remove bacterial biofilms from industrial surfaces [16–18] and the development of tools to improve pathogen detection [19]. Since the approval of phage-based products to use in the food industry sector by the US FDA in 2006, some new bacteriophage products are commercially available. These products consist of a mixture of one or more bacteriophages infecting *L. monocytogenes* (PhageGuard Listex, Microcos Food Safety B.V., Wageningen, The Netherlands; ListShield™, Intralytix Inc., Baltimore, MD, USA), *E. coli* O157: H7 (EcoShield™, Intralytix Inc., Baltimore, MD, USA) and *Salmonella* (SalmoFresh™, Intralytix Inc., Baltimore, MD, USA; PhageGuard S, Microcos Food Safety B.V., Wageningen, The Netherlands).

We had previously isolated and characterized the *S. aureus* infecting phage vB_SauM-phiIPLA-RODI (in short, phiIPLA-RODI) that belongs to the *Myoviridae* family and exhibits a wide host range [16]. In challenge assays against *S. aureus* cultures, the phage reduced the viable counts by 5 log units in 8 h. Moreover, exposure of biofilms to this phage also reduced adhered bacteria by 2 log units [16]. Therefore, the lytic ability of phiIPLA-RODI against planktonic and sessile cells supports its potential as an antimicrobial to both remove staphylococcal biofilms and to treat *S. aureus* infections.

The use of phages as antimicrobials in the clinic and the food industry requires large-scale and reproducible production of phage cultivation. Temperature, media composition, bacteria and bacteriophage concentration are factors that can affect phage production [20].

In this regard, the aim of the present work was to optimize the propagation of phage phiIPLA-RODI by using a food-grade species instead of the original pathogenic host in a laboratory scale applying the response surface methodology (RSM). This methodology is a collection of mathematical and statistical techniques that allow the analysis of the relationship between a set of controllable experimental factors and the observed results of the variable of interest (response) to optimize the response [21,22]. Unlike the present work, the scarce studies on the production of bacteriophages that have already applied RSM have used the original bacterial host and other factors that affect phage production [23].

We used a food-grade strain of the species *Staphylococcus xylosum* as an alternative host to reduce the risk of growing massive quantities of a bacterial pathogen. The effects of different levels of the expected influential variables such as temperature, agitation, initial bacterial and bacteriophage concentration were investigated by using RSM. The equation at the region of maximum phage yield was validated, and a definitive model incorporating the validation data was deduced. Based on this model, and using the desirability approach, the optimal operating conditions were established.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains, Bacteriophage and Media

Staphylococcal strains were isolated in Baird-Parker (BP) agar supplemented with egg yolk tellurite emulsion (Scharlau, Barcelona, Spain) and routinely grown in Tryptic Soy Broth (TSB, Scharlau, Barcelona, Spain) with shaking (Excella E24 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) or Tryptic Soy Agar (TSA), at 37 °C.

The food-grade strain *Staphylococcus xylosum* CTC1642, isolated from a fermented meat product (IRTA, Monells, Girona, Spain) and the strain *S. aureus* IPLA1, isolated from a dairy product (IPLA-CSIC, Villaviciosa, Asturias, Spain), were used to propagate the *S. aureus*-infecting bacteriophage phiIPLA-RODI.

Phage titer was assessed by plaque assay. One-hundred µL of an overnight culture (about 10⁹ colony-forming unit (CFU)/mL) of the host strains were mixed with 100 µL of serial phage dilutions. These mixtures were added to 5 mL of molten TSA overlay (0.7% agar), poured onto TSA plates, incubated at 37 °C for 18–24 h, and the lysis plaques counted [16].

For selecting the food-grade host for phage propagation purposes, preliminary plaque assays with phage phiIPLA-RODI were performed on several food-grade strains, kindly provided by Dr Margarita Garriga (IRTA, Monells, Girona, Spain): *S. xylosum* strains (CTC1638, CTC1642 and CTC1644) and *Staphylococcus carnosus* strains (CTC6064, CTC6071 and CTC6072). The strain *S. carnosus* TM300, kindly provided by Dr Gabi Bierbaum (University of Bonn, Germany) was also tested. The efficiency of plating (EOP) was calculated by dividing the phage titer obtained on each of the tested strains by the phage titer on the reference strain *S. aureus* IPLA1.

The host range of phiIPLA-RODI lysates obtained by propagation on CTC1642 and IPLA1 was determined by plaque assay on some other staphylococcal species previously tested [16]. Some of them such as *S. lugdunensis* ZL5-11, *S. pasteurii* ZL16-6, *S. arlettae* ZL114-5, *S. xylosum* ZL61-2, *S. gallinarum* ZL90-5 and *S. kloosii* ZL74-2, were isolated from women's breast milk [16], while others (*S. aureus* IPLA15 and IPLA16) were isolated from meat industry surfaces [24]. The efficiency of plating (EOP) of both phage lysates on each strain was calculated as indicated above.

2.2. Biofilm Removal by Phage phiIPLA-RODI Propagated on *S. xylosum* CTC1642 and *S. aureus* IPLA1

Overnight cultures of *S. aureus* IPLA16 were diluted to 10⁶ CFU/mL into fresh TSB supplemented with 0.25% glucose. Aliquots of 200 µL of each culture were poured into the wells of a polystyrene microtiter plate (TC Microwell 96U w/lid nunclon DSI plates, Thermo Scientific, Madrid, Spain). Biofilms were grown for 24 h at 37 °C. Wells were then washed twice with PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM 138 Na₂HPO₄ and 2 mM KH₂PO₄; pH 7.4). To compare the biofilm degradation ability of each phage lysate, 200 µL of phiIPLA-RODI propagated on *S. aureus* IPLA1 or *S. xylosum* CTC1642 were added to each well (10⁸ plaque-forming unit (PFU)/well). SM buffer (20 mM Tris HCl, 10 mM of MgSO₄, 10 mM of Ca(NO₃)₂ and 0.1 M of NaCl, pH 7.5) was added for control purposes. The microwell plates were incubated for 4 h at 37 °C. The supernatants were removed, and wells washed once with SM buffer (20 mM Tris HCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM Ca(NO₃)₂ and 0.1 M NaCl, pH 7.5) and air-dried for 15 min at room temperature. The biomass adhered to the wells was determined by crystal violet (0.1%, w/v) staining as described previously [25]. All the assays were performed using three biological replicates.

2.3. One-Step Growth Curve

One-step growth curve assays were carried out with phage phiIPLA-RODI, using the sensitive strains *S. aureus* IPLA1 and *S. xylosum* CTC1642. A standardised protocol, previously described [26], was adapted for this study.

Curves were performed in TSB supplemented with Ca(NO₃)₂ (10 mmol L⁻¹) and MgSO₄ (10 mmol L⁻¹) using a multiplicity of infection (MOI) of 0.01. Mid-exponential-phase cultures (10 mL) of *S. aureus* IPLA1 and *S. xylosum* CTC1642 (OD₆₀₀ = 0.1) were collected by centrifugation and suspended into 1 mL of fresh TSB. The phage was added and allowed to adsorb for 5 min at 37 °C with shaking.

The mixture was then centrifuged, pelleted cells resuspended in 10 mL of TSB, and incubation continued at 37 °C. Samples were first taken at 5 min intervals for 30 min, and subsequently at 10 min intervals. Each sample was immediately diluted and plated for phage titration.

2.4. Bacteriophage Amplification: Conventional Phage Propagation

Bacteriophage phiIPLA-RODI was routinely propagated on *S. aureus* IPLA1 and *S. xylosus* CTC1642, according to the following procedure: TSB broth was inoculated with 1% (*v/v*) inoculum of an overnight culture of the strains indicated above, and incubated at 37 °C with shaking until an $OD_{600} = 0.1$ (10^7 CFU/mL) was reached. Phage was added to the bacterial culture at MOI of 1.0 and incubation proceeded for a further 3.5 h at 37 °C with shaking. Phage preparations were obtained by centrifugation and further filtration to remove bacterial cells and debris.

The phage titer was determined by the plaque assay using 100 μ L of an *S. aureus* IPLA1 overnight culture as a host, and 100 μ L of the phage dilution. This mixture was added to 5 mL of molten TSA overlay (0.7% agar) and poured onto TSA plates and incubated at 37 °C for 18–24 h [16].

2.5. Bacteriophage Amplification: Phage Propagation for Optimization Purposes

Frozen stocks (−80 °C) of the strain *S. xylosus* CTC1642 (about 10^8 CFU/mL) were quickly thawed and used to inoculate at different concentrations (CFU/mL) in 50 mL Falcon tubes filled with 10 mL of TSB broth. The actual viable cell counts were determined immediately after inoculation by plating decimal dilutions of samples onto TSA.

For phage propagation, cultures were infected with different concentrations (PFU/mL) of phage phiIPLA-RODI. The combined effect of initial phage titer, initial host concentration, temperature, and agitation on phage yield (final phage titer) and phage amplification ratio (estimated as the difference between final phage titer and the initial phage titer, expressed in \log_{10} values) was evaluated after 3.5 h of incubation. The phage titer was determined as described in the previous section.

2.6. Experimental Design

The assays consisted of three successive designs that allowed estimating the effects of four independent continuous variables (initial phage titer, initial bacterial concentration, temperature, and agitation) on the phage yield and optimizing the conditions that could eventually result in the highest phage yield. The first design was used for an initial exploration of the experimental region in which phage production was expected to occur. It consisted of a quadratic Central Composite Design with the following ranges of the variables: initial phage titer (5.00 to 8.00 \log_{10} PFU/mL); initial bacterial concentration (6.0 to 8.0 \log_{10} CFU/mL); temperature (21 to 37 °C) and agitation (20 to 250 rpm). The objective of the second design was focused on the effect of temperature, using a D-optimal design, at fixed agitation (135 rpm). It had the following ranges for the variables: initial phage titer (6.0 to 8.0 \log_{10} PFU/mL); initial bacterial concentration (5.0 to 7.0 \log_{10} CFU/mL) and temperature (34 to 40 °C). Finally, the third design aimed at developing a Response Surface equation, using Central Composite Design, to predict phage production in the region of highest yield. It included only the initial phage titer (5.79 to 7.21 \log_{10} PFU/mL) and initial bacterial concentration (5.59 to 8.41 \log_{10} CFU/mL), while temperature and agitation were fixed at 38 °C and 135 rpm, respectively. The characteristics of these designs (and their respective yields) are summarized in Table 1. The levels of variables for all the designs were given by the program Design-Expert software version 7.0 (State-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA), provided their ranges and type of design. The order of the run performance was always randomly chosen. However, the values for initial bacterial populations, although intended to be those proposed by the designs, were difficult to fix accurately. Therefore, the actual bacterial concentrations reached just after inoculation, as determined by viable cell counts, were used for the statistical analysis.

Table 1. Experimental designs used for optimizing the phage yield (response) as a function of temperature, initial bacterial concentration, initial phage titer and agitation. Responses are also included.

Runs	1st Tentative Design (Central Composite)					2nd Design (D-Optimal) ^a				3rd Design (Central Composite) ^b			
	Phage Titer	Bacterial Concentration	Temperature (°C)	Agitation (rpm)	Phage Yield	Phage Titer	Bacterial Concentration	Temperature (°C)	Phage Yield	Phage Titer	Bacterial Concentration	Phage Yield	
1	7.39	7.56	24.2	67	5.53	8.00	5.78	40.0	7.42	7.00	6.85	8.4	
2	6.50	7.28	29.0	135	5.67	6.00	5.95	34.0	6.61	6.50	7.72	9.0	
3	6.50	8.27	29.0	135	4.37	7.19	7.45	37.6	8.43	6.50	7.35	9.3	
4	5.61	6.96	33.8	67	6.66	7.19	6.30	34.0	6.86	6.50	6.05	8.5	
5	5.00	7.53	29.0	135	4.86	6.00	7.44	34.0	7.57	7.21	7.61	8.9	
6	5.61	7.99	33.8	203	4.08	7.18	6.48	37.8	7.37	5.79	7.41	9.1	
7	6.50	7.51	29.0	135	5.79	8.00	6.81	40.0	7.81	6.00	8.15	3.7	
8	6.50	7.62	29.0	135	6.00	8.00	5.66	36.1	8.27	7.00	8.11	8.3	
9	6.50	7.38	21.0	135	5.51	6.00	6.66	37.6	8.05	6.50	7.61	9.0	
10	6.50	6.25	29.0	135	6.13	6.00	7.82	40.0	8.12	6.50	7.34	9.0	
11	6.50	7.57	29.0	135	5.68	6.00	7.43	40.0	8.27	6.00	6.29	8.7	
12	8.00	7.11	29.0	135	6.80	8.00	7.48	34.0	8.04	6.50	7.53	9.1	
13	5.61	7.88	24.2	203	4.23	6.00	5.77	34.0	7.58	6.50	8.40	4.1	
14	7.39	7.01	24.2	203	7.06	6.70	5.86	40.0	7.54				
15	5.61	6.99	24.2	67	5.25								
16	6.50	7.04	29.0	20	5.02								
17	6.50	7.11	29.0	135	5.26								
18	6.50	6.85	37.0	135	8.13								
19	7.39	7.15	33.8	203	7.34								
20	7.39	7.70	33.8	67	6.83								
21	6.50	7.18	29.0	250	6.43								

Note: Phage titer and phage yield are expressed as log₁₀ plaque-forming unit (PFU)/mL and bacterial concentration is expressed as log₁₀ colony-forming unit (CFU)/mL. The bacterial concentrations correspond to the effective levels reached in the experiment. Standard deviations for the design values (as estimated from the analysis of variance (ANOVA) pure error) were 0.34, 0.14, 0.13 log₁₀ PFU/mL, respectively. ^{a,b} Agitation fixed at 135 rpm. ^b Temperature fixed at 38 °C.

2.7. Analysis of Results, Model Validation, and Final Response Surface (RS) Equation

The effects of the above-indicated variables (factors) on phage propagation (initial phage titer (A), initial bacterial concentration (B), temperature (C) and agitation (D)) were analyzed by the response surface methodology (RSM), using the following general quadratic model:

$$y = \beta_0 + \sum_i^k \beta_i x_i + \sum_i^k x_i^2 + \sum_i^k \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j$$

where k was 4, 3 and 2 for first, second, and third design, respectively [27]. The significant influential variables were those suggested by the sequential sum of squares (Type I) and supported by the corresponding ANOVA (partial sum of squares type III). The final models were obtained by a stepwise process, using $p \leq 0.05$ and $p \geq 0.10$ as criteria for entering and removal of variables, respectively. The effects of the variables and model fits were also checked graphically. For the validation of the third model, nine additional assays were performed with the initial phage titer fixed at $6.5 \log_{10}$ PFU/mL and the initial bacterial populations around the levels of maximal phage yield. A final equation for the model was developed by enlarging the data from the third design with the validation results. This last model was used for obtaining the conditions which maximize the phage yield and amplification.

2.8. Statistical Analysis

Statistical analyses for phage propagation were performed using the statistical package IBM SPSS Statistics for Windows Version 23 (IBM Corp. Armonk, NY, USA). Data related to phage propagation carried out with the control host (*S. aureus* IPLA1), and test host (*S. xyloso* CTC1642) were subjected to one-way ANOVA, and the Student-Newman-Keuls (SNK) test was used for comparison of means at a level of significance $p < 0.05$. Three biological replicates were used in all the assays.

For optimizing the phage propagation on *S. xyloso* CTC1642, the experiments were always designed and analyzed using Design-Expert software version 7.0 (State-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). Final optimization was achieved using the desirability approach, which finds operating conditions that provide the “most desirable” response values. The desirability function d_i (Y_i) assigns numbers between 0 (undesirable value) and 1 (ideal response) to the possible values of Y_i (phage yield or phage amplification ratio). Usually, the individual desirability values are combined using the geometric mean, which gives the overall desirability (D) which is maximized with respect to the controlled variables.

3. Results

3.1. PhiIPLA-RODI Infects Food-Grade *S. xyloso* Strains and Other Staphylococcal Species

To avoid amplification of virulence genes or the risk of accidental contamination with the original host (*S. aureus*), the ability of phage phiIPLA-RODI to infect food-grade staphylococcal strains was tested. The sensitivity of three *S. xyloso* and four *S. carnosus* strains was determined by the plaque assay, and the efficiency of plating (EOP) was also calculated. The EOP was determined by comparison to the reference strain *S. aureus* IPLA1. None of the *S. carnosus* strains and *S. xyloso* CTC1638 was sensitive to the phage. By contrast, EOP values of 0.31 and 0.00004 were obtained for *S. xyloso* CTC1642 and *S. xyloso* CTC1644, respectively. According to these results, *S. xyloso* CTC1642 was selected as a potential host for further phage propagation.

One-step growth curves of phage phiIPLA-RODI, pre-amplified on *S. aureus* IPLA1, were obtained on both *S. aureus* IPLA1 and *S. xyloso* CTC1642 (Figure 1). Values of burst size (number of viral particles per infected cell) determined at 60 min after infection were 25 and 10, respectively.

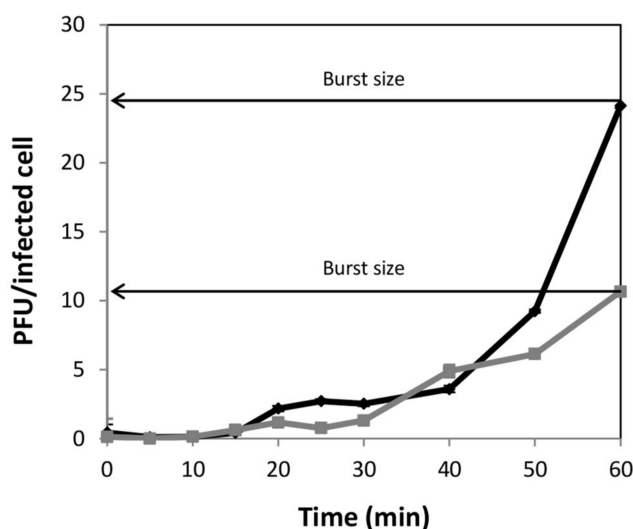


Figure 1. One-step growth curves of phiIPLA-RODI on *S. aureus* IPLA1 (black diamonds) and *S. xylosus* CTC1642 (grey squares), respectively. Values correspond to the number of plaque-forming unit (PFU) per infected cell. Each data point shows the mean \pm standard deviation for three independent experiments.

Data of phage phiIPLA-RODI propagation on *S. aureus* IPLA1 were compared with those obtained on *S. xylosus* CTC1642 under the same experimental conditions used in conventional phage propagation, as explained in M&M section. The titer of lysates obtained using *S. aureus* IPLA1 as a host strain ($8.9 \pm 0.1 \log_{10}$ PFU/mL) was significantly higher ($p < 0.05$) than the value of suspensions propagated on *S. xylosus* ($8.2 \pm 0.2 \log_{10}$ PFU/mL).

Regardless of the staphylococcal species used for phage propagation, phiIPLA-RODI showed the same host range and similar EOPs on the different *Staphylococcus* species tested (Table S1). In addition, the phage propagation on IPLA1 and CTC1642 strains did not result in any significant differences in its biofilm removal ability (Figure S1).

3.2. Identification of Experimental Factors Affecting Phage Yield

The first experimental design consisted of 21 propagation runs which included the four experimental factors (A: initial phage titer, B: initial bacterial concentration, C: temperature and D: agitation) expected to influence the phage yield (Table 1). The levels used were those proposed by the software (except for bacteria which concentrations were those effectively reached in the experiment as commented above). The phage yield responses were analyzed by the sequential model sum of squares and the fit subjected to the corresponding ANOVA. From the analysis (Table 2), it was deduced that the effect of agitation on the phage yield was not significant ($p > 0.05$) in the range of 20–250 rpm (i.e., it was not retained). On the contrary, the initial phage titer and temperature showed significant (at $p < 0.05$) linear effects while the initial bacterial concentration had a significant (at $p \leq 0.10$) quadratic effect. The retention of the non-significant linear term of the initial bacterial population is due to the application of the hierarchical principle, which establishes the maintenance of lower order term (linear in this case) when one of higher order is retained (Table 2).

These effects are shown graphically in Figure 2 as functions of several variables. Regardless of the initial bacterial population, an increase in the initial phage titer, within the ranges studied in this case, always led to a higher phage yield (Figure 2A). Also, a linear increase of the phage yield was observed as the temperature rose (Figure 2B). Moreover, as the initial population of bacteria and temperature increased, there were a progressive (quadratic) decrease and a linear increment of phage yield, respectively (Figure 2B,C).

Table 2. ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model (partial sum of squares type III) of the first design.

Source	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F Value	p-Value (Prob > F)
Model	16.99	4	4.25	12.45	<0.0001 significant
A-Phage	4.46	1	4.46	13.09	0.0023
B-Bacteria	0.78	1	0.78	2.28	0.1508
C-Temperature	3.62	1	3.62	10.62	0.0049
B²	1.21	1	1.21	3.56	0.0775
Residual	5.46	16	0.34		
Cor total	22.44	20			

Notes: The term B-Bacteria, was introduced in application of the hierarchical principle. Alfa to enter, $p \leq 0.05$, alfa to exit, $p \geq 0.10$.

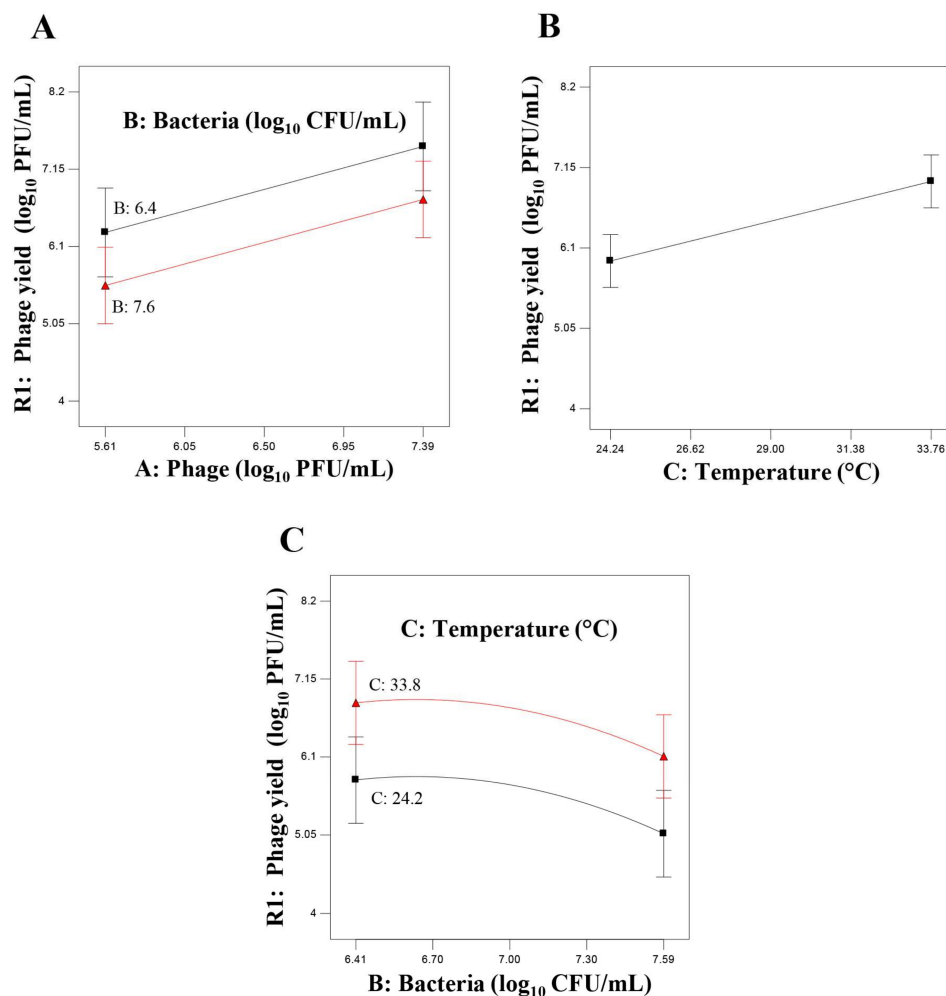


Figure 2. Plot of the first design response. Phage yield (response) as a function of: initial phage titer at fixed temperature (33.76 °C) and agitation (135 rpm) for two levels of bacteria (A); temperature at fixed initial phage titer (6.74 log₁₀ PFU/mL), initial bacterial concentration (7.00 log₁₀ CFU/mL) and agitation (135 rpm) (B); and initial bacterial concentration at fixed initial phage titer (6.43 log₁₀ PFU/mL) and agitation (135 rpm) for two temperature levels (C).

Therefore, a new design was performed in which the agitation was fixed at an intermediate level (135 rpm) since its effect on phage yield was not significant ($p > 0.05$). On the contrary, the temperature was increased to the range 34–40 °C, due to the favorable linear effects previously observed (Figure 2B). Finally, the ranges of the initial phage and bacterial concentration were fixed

from 6.00 to 8.00 log₁₀ PFU/mL and from 5.00 to 7.00 log₁₀ CFU/mL respectively, to include the experimental regions of high phage yield.

In these conditions, the effect of the initial phage concentration was not significant but the temperature had a significant quadratic effect (Table 3), regardless of the concentration of the initial bacterial population, and showed a clear optimum around 38 °C (Figure 3). As in the first design, the effect of the initial bacterial population on the phage yield was also quadratic and significant at $p \leq 0.10$ (Table 3) with a high initial bacterial population resulting in a lower phage yield (Figure 3), regardless of temperature. Hence, the most relevant conclusion of this design was the quadratic effect of temperature and the identification of the level for maximum phage yield.

Table 3. ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model (partial sum of squares type III) of the second design.

Source	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F Value	p-Value Prob > F
Model	2.51	4	0.63	4.59	0.0271
B-Bacteria	0.13	1	0.13	0.91	0.3644
C-Temperature	0.30	1	0.30	2.19	0.1734
B²	0.52	1	0.52	3.76	0.0844
C²	0.86	1	0.86	6.28	0.0336
Residual	1.23	9	0.14		
Cor total	3.75	13			

Notes: The term B-Bacteria and C-Temperature were introduced in application of the hierarchical principle. Alfa to enter, $p \leq 0.05$, alfa to exit, $p \geq 0.10$.

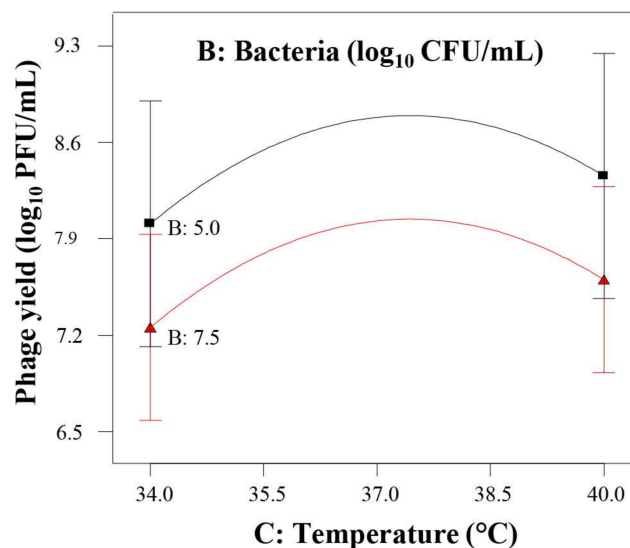


Figure 3. Plot of the second design response. Phage yield (response) as a function of temperature, at two initial bacterial concentrations, and fixed initial phage titer (7.32 log₁₀ PFU/mL).

3.3. Response Surface Model for Phage phiIPLA-RODI Yield

The results from the previous design led to planning a third one in which temperature was fixed at its optimum (38 °C) and agitation at 135 rpm, while the ranges of phage and bacteria were maintained similar (Table 1, third design). However, as commented above, the design levels for the theoretical initial bacterial concentrations were difficult to reach and resulted in the actual values included in Table 1, which were used for the statistical analysis. The analysis of this design revealed, within the

ranges of the variables assayed, a non-significant effect of initial phage titer and a persistent quadratic significant effect of the initial bacterial population (Table 4). The equation had the following expression:

$$\text{Phage yield} \left(\log_{10} \frac{\text{PFU}}{\text{mL}} \right) = -60.36 + 20.46 \times \text{bacteria} - 1.50 \times \text{bacteria}^2 \quad (1)$$

Table 4. ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model (partial sum of squares type III) of the third design.

Source	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F Value	p-Value Prob > F
Model	37.26	2	18.63	20.01	<0.0001 significant
B-Bacteria	2.15	1	2.15	2.30	0.1455
B ²	18.16	1	18.16	19.50	0.0003
Residual	1.04	18	0.058		
Lack of fit	0.78	16	0.049	0.37	0.9042 not significant
Pure error	0.26	2	0.13		
Cor total	4.03	19			

Notes: The term B-Bacteria was introduced in application of the hierarchical principle. Alfa to enter, $p \leq 0.05$, alfa to exit, $p \geq 0.10$.

The model showed a significant fit and an insignificant lack of fit (Table 4). The response surface plot of the equation (Figure 4) was a plane with a slightly rising hill which reached its maximum at an initial bacterial concentration of 6.82 CFU/mL. Then, it decreased sharply at higher bacterial concentrations because of the negative sign and quadratic exponent of this variable (Equation (1)). Moreover, the phage titer has been particularly high in some experiments with up to 9.3 log₁₀ PFU/mL (Table 1), the highest titer found so far. That is, the third design pointed to combinations of the variables which resulted in maximum response (Figure 4), due to the Equation (1) structure.

$$\text{Phage yield} = -60.36 + 20.46 * \text{Bacteria} - 1.50 * \text{Bacteria}^2$$

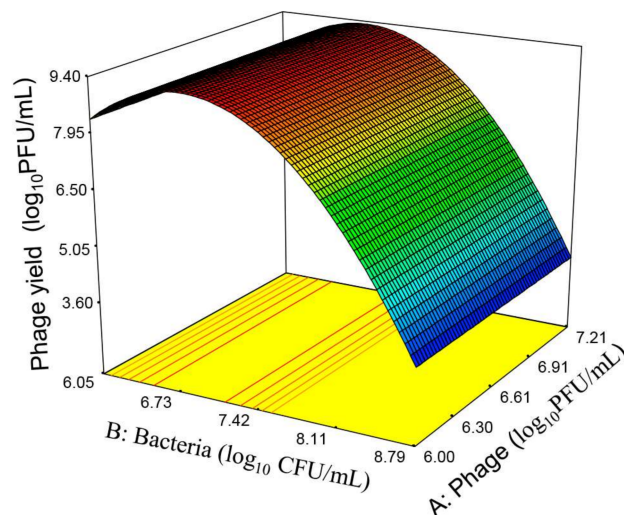


Figure 4. Response surface plot of phage yield as a function of the initial bacterial population and phage titer, based on the experiments from the third design, with a maximum at 6.82 log₁₀ CFU/mL initial bacteria.

3.4. Validation of RSM

Once reached the region of maximum phage production, nine validation experiments were performed at the levels specified in Table 5. There were no differences between the experimentally observed and predicted values. Therefore, the model (Equation (1)) could be used to make predictions.

Table 5. Experimental conditions, predicted responses (\pm SE) according to the RS model developed for the 3rd experimental design, and actual results for the validation experiments.

Initial Bacteria Population	Initial Phage Titer	Phage Yield, Validation Experiments	Predicted Phage Yield, RS 3rd Design	Predicted Phage Yield, RS Enlarged 3rd Design ^a
7.51	6.50	8.8 \pm 0.1	8.6 \pm 0.5	8.7 \pm 0.3
7.42	6.50	8.8 \pm 0.1	8.7 \pm 0.5	8.8 \pm 0.3
7.63	6.50	8.8 \pm 0.1	8.3 \pm 0.5	8.4 \pm 0.3
7.56	6.50	8.7 \pm 0.1	8.5 \pm 0.5	8.5 \pm 0.3
7.72	6.50	8.8 \pm 0.1	8.1 \pm 0.5	8.2 \pm 0.3
7.62	6.50	8.8 \pm 0.1	8.3 \pm 0.5	8.4 \pm 0.3
7.35	6.50	8.6 \pm 0.1	8.9 \pm 0.5	8.9 \pm 0.3
7.28	6.50	8.5 \pm 0.1	9.0 \pm 0.5	9.0 \pm 0.3
7.39	6.50	8.8 \pm 0.1	8.8 \pm 0.5	8.9 \pm 0.3

Note: bacteria and phage populations are expressed as \log_{10} CFU/mL and $10\log_{10}$ PFU/mL, respectively. ^a Predicted responses (\pm SE) based on the final Response Surface including the validation data.

3.5. Final Equations for the Phage Production and Phage Amplification Ratio

The results from the third experimental design were enlarged with those obtained in the validation tests. The new data set was then used to estimate a definitive RS from a higher number of responses and degrees of freedom. The model estimated was, as in the case of the third design, a quadratic function of the initial bacterial concentration which also retained the linear term to preserve the hierarchical principle (Table 6). Its equation, expressed in terms of the physical variable units, was the following:

$$\text{Phage yield} \left(\log_{10} \frac{\text{PFU}}{\text{mL}} \right) = -63.38 + 21.24 \times \text{bacteria} - 1.55 \times \text{bacteria}^2 \quad (2)$$

where bacteria is the initial bacterial concentration in the culture medium, expressed in \log_{10} CFU/mL. The Equation (2) was quite similar to that obtained when using only the data from the third design (Equation (1)) and also reached the maximum at a very close initial bacterial concentration (6.85 vs. 6.82 \log_{10} CFU/mL). The predicted phage yields for the validation data using this final equation were similar to those deduced previously from the third design, but the predictions had a lower dispersion (0.5 vs. 0.3 SE) (Table 5, last two columns).

Table 6. ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model (partial sum of squares type III) based on the data from the third design and the validation data.

Source	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F Value	p-Value Prob > F
Model	37.26	2	18.63	20.01	<0.0001 significant
B-Bacteria	2.15	1	2.15	2.30	0.1455
B ²	18.16	1	18.16	19.50	0.0003
Residual	1.04	18	0.058		
Lack of fit	0.78	16	0.049	0.37	0.9042 not significant
Pure error	0.26	2	0.13		
Cor total	4.03	19			

Notes: The term B-Bacteria was introduced in application of the hierarchical principle. Alfa to enter, $p \leq 0.05$, alfa to exit, $p \geq 0.10$.

After optimization, propagation of phiIPLA-RODI on *S. xyloso* CTC1642 reached an average titer of $8.9 \pm 0.1 \log_{10}$ PFU/mL, which was not significantly different from that obtained with the reference strain of *S. aureus* IPLA1 ($8.9 \pm 0.2 \log_{10}$ PFU/mL) ($p > 0.05$).

However, not only the phage yield is important but also the phage amplification ratio (i.e., the times the phage population (expressed in \log_{10}) is multiplied during the propagation process). The RS model estimated was also significant, had a non-significant lack of fit (Equation (3)), and was quite similar to that previously deduced for phage yield (Equation (2)). It took the following form:

$$\text{Phage amplification ratio} = -60.58 + 18.63 \times \text{bacteria} - 1.37 \times \text{bacteria}^2 \quad (3)$$

Mathematically, regardless of the initial phage population, the optimum phage amplification ratio (or population multiplication) is also situated at bacterial concentrations around $6.8 \log_{10}$ CFU/mL ($18.63/2 \times 1.37$, since the first derivative at the maximum, should be null). However, it may also be obtained considering the initial bacteria and phage titer simultaneously. With this objective, the desirability approach was applied, using the following criteria: initial bacterial concentration within the range 6–9 \log_{10} CFU/mL, minimum initial phage titer in the range 6–8 \log_{10} PFU/mL, maximum phage yield and phage amplification ratio. The results indicated that, by using initial bacterial and phage concentrations of about $7.07 \log_{10}$ CFU/mL and $6.00 \log_{10}$ PFU/mL, respectively, a remarkable phage yield ($9.25 \pm 0.9 \log_{10}$ PFU/mL) and phage amplification ratio (2.72 ± 0.90) could be obtained (Figure 5), with a total desirability of 0.96 (quite close to the ideal value of 1.00). Therefore, the process may reach the highest phage yield and, at the same time, maximum amplification (the initial phage is increased by almost 3 log units).

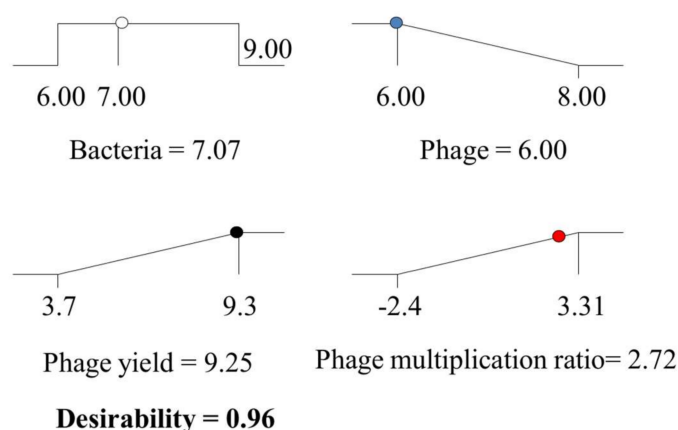


Figure 5. Optimization of both final phage yield and phage multiplication ratio. Final phage yield (●) and phage multiplication ratio (●), as a function of initial bacterial populations (○) and phage titers (●), using the desirability approach as implemented in Design Expert.

4. Discussion

To exploit the advantages of bacteriophages as antimicrobials, it is essential to adapt their production to meet quality and safety requirements for sustainable phage therapy products [28]. In this context, the use of a surrogate host such as a food-grade bacterium minimizes the risk of toxin or host contamination on phage preparations. The ability of phage phiIPLA-RODI to infect a wide spectrum of staphylococcal strains [16] allowed selecting a *S. xyloso* strain, from meat origin, to propagate the phage. A reduction in the phage yield (final phage titer) could be expected due to the lower burst size calculated in *S. xyloso* compared with *S. aureus* (10 versus 25 phage particles per infected cell). In this regard, a reduction in the burst size was also observed when the *Salmonella* phage phi PVP-SE3 was propagated in the non-pathogenic strain *E. coli* BL21 [29], while a similar number of phage particles per infected cell were obtained after infection of *S. xyloso* by the *S. aureus* infecting phage Team1 [30]. As previously observed in other phages [30], the host range and the EOP value shown by phiIPLA-RODI when propagated on both *S. xyloso* CTC1642 and *S. aureus* IPLA1 were fairly similar. Besides, the ability of phiIPLA-RODI to remove biofilms was similar regardless of the

bacterial host used for phage propagation. Overall, the lack of pathogenicity of the host strain *S. xyloso* CTC1642 and consequently, the safety of the final phage product justify, in our opinion, the use of the food-grade strain even though a lower phage yield is obtained. In an attempt to counteract this disadvantage, we optimized the phiIPLA-RODI propagation process by using RSM since it is handy for studying processes in which the response is influenced by several variables [22]. In fact, this method was previously used to optimize the production of an *E. coli* infecting filamentous phage [23]. It should be noticed, however, that filamentous phages do not reproduce by lysing bacteria, instead, they are secreted into the environment without killing the host, while the life cycle of myovirus phages ends with the lysis of the host. Likewise, Grieco et al. [23] have used temperature, dissolved oxygen and pH as independent variables while, in our study, phage and bacterial concentration, temperature and agitation were tentatively considered initial influential on the phage yield when *S. xyloso* is used as propagation host. Remarkably, the initial bacterial concentration was particularly significant for phiIPLA-RODI propagation as it had a quadratic effect on the phage yield.

The propagation process is the result of a succession of several infection cycles, and each of them consists of an adsorption period, nucleic acid uptake, latent period and progeny release. The duration of these steps and the number of phage particles produced per infected cell will determine the phage yield [31,32]. It is well known that phage-host interactions are affected by environmental conditions that alter the physiological state of bacteria, through changing their susceptibility to phage infection and the phage productivity [33]. Moreover, optimal bacteriophage infection traditionally requires bacterial host growing exponentially, although some bacteriophages like T4 can efficiently infect *E. coli* in stationary phase and kill the host after a hibernation period [34].

In this context, a first design was used as initial guidance for approaching the production of phages in an experimental region (space limited by the range of variables) in which, according to previous non-systematic assays, high phage yield (response) were expected. The results showed that agitation within the range assayed did not affect phage yield, however, agitation might favor the encounter between bacteria and phage needed for the phage infection to take place and prevent the bacterial cell from sedimentation. Therefore, the use of an intermediate level (135 rpm) was fixed for further assays. For the variable temperature, a wide range of 21–37 °C was initially selected to include values even lower than the optimal for *Staphylococcus* growth because other authors have previously observed improved phage production at temperatures below the optimum for bacterial host growth [23]. The data from the assays proposed by the first design pointed out that the range of temperature was not appropriate since the effect on the phage yield was linear and increased progressively as the temperature rose. Therefore, these results supported the notion of using a higher temperature around those that favor host metabolism for additional designs. The linear effect of initial phage titer and the quadratic effect of the initial bacterial concentration on the phage yield also suggested to increase the initial phage concentration and to decrease the initial bacteria concentration. Hence, the analysis of the data from the experiments proposed by the first design reduced the influential variables to three: initial phage titer, initial bacterial concentration and temperature.

Subsequently, the main goal of the second design was exploring the effect of temperature in detail, covering the region of optimal host growth and, eventually, the optimum level of phage yield. Its results confirmed the pertinence of increasing temperature and showed a quadratic effect defining the optimum temperature at 38 °C that was adopted for further assays. The range of the initial bacterial population was still appropriate, and the ANOVA led to the identification of a quadratic effect ($p \leq 0.10$) for this variable, in agreement with the results of the first design. The effect of initial phage concentration was not statistically significant under the experimental conditions proposed by the second design. The reason for this observation could be the different ranges of temperature tested. Indeed, it is well known that the lytic phage infection process is very much dependent on the bacterial host metabolic machinery. Therefore, a temperature that improves bacterial metabolic activity will result in a better phage yield. In this regard, it should be noted that the range used in the second design (34–40 °C) is more appropriate for the bacterial host growth than that used in the first design

(21–37 °C), resulting in an enhanced phage yield and consequently, the initial phage concentration has not longer statistically significant effect on the response.

Once the optimum temperature was defined, the influential variables were reduced to only two: initial phage titer and bacterial concentration. Further analysis of the relationship between these variables was approached by the third design in which the interest was focused on finding the equation of the RS defining the region of maximum phage production, already outlined from the results of the previous design. The ranges of both variables were established taking into account that, for an efficient infection process, phages should be able to encounter the bacterial cell host. For this purpose, the bacterial population must exceed its proliferation threshold [35,36], to facilitate the initial phage titer to increase. It should be noticed that MOI (as phage/bacteria ratio) has not been used as independent variable in the current study because similar MOI values are obtained from different concentrations of initial phage and bacteria. In fact, the particular phage and bacteria concentrations used for phage propagation did really result in different values of the final phage titer. Having fixed agitation and temperature, the data from the experimental assays of the third design confirmed the quadratic effect of bacteria regardless of the initial phage titer, which was not significant within the studied range. All the parameters related to the model fit were appropriate. In addition, several independent validation experiments showed also good agreement with its predictions and, remarkably, the incorporation of validation data into those from the third model allowed deducing a final RS model with a higher degree of freedom for the medium standard error (MSE) and narrower confidence limits for the estimations. Also, from the third model, enlarged with the validation data, a final model could be deduced which led not only to the conditions of optimal phage production but also revealed a sharp decrease in the phage yield at bacterial concentrations above $7.5 \log_{10}$ CFU/mL. This behavior could be due to the adsorption of a proportion of the new viral progeny to the host cells that were not initially infected, which could partially hamper its detection by phage titration.

The optimization process allowed therefore maximizing the phage yield and the phage amplification ratio, while minimizing the initial phage concentration and using an initial bacterial population between the ranges studied in the third design. The optimization process deduced several possible combinations. Among them, it was chosen that providing the highest desirability which consisted of the initial bacterial population, $7.07 \log_{10}$ CFU/mL; and initial phage titer, $6.00 \log_{10}$ PFU/mL (Figure 5), while maintaining agitation (135 rpm) and temperature (38 °C) at their fixed levels. Using these conditions, it is expected a phage yield of up to $9.25 \pm 0.35 \log_{10}$ CFU/mL along with a phage amplification ratio of 2.72 log units over the initial phage titer. The global desirability, defined as the geometric mean of desirability values of the phage yield and phage amplification ratio, would be in this case high (0.96) and fairly close to the most “desirable” response 1.00. These results support the use of the food-grade strain *S. xylosus* CTC1642 as an appropriate alternative of the pathogenic strain *S. aureus* IPLA1 for phiIPLA-RODI propagation at the setting conditions established by the final RS model. The setting parameters could be the starting point for performing the upscaled production of the phage that would be required for its potential use in clinical [28] and food safety [15] applications.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1999-4915/10/4/153/s1>.

Acknowledgments: This research study was supported by grants AGL2015-65673-R (Ministry of Science and Innovation, Spain), GRUPIN14-139 (Program of Science, Technology and Innovation 2013–2017 and FEDER EU funds, Principado de Asturias, Spain). FNAL thanks a Ramón y Cajal contract. PG, BM, and AR are members of the FWO Vlaanderen funded “Phagebiotics” research community (WO.016.14) and the bacteriophage network FAGOMA II.

Author Contributions: Eva González-Menéndez, Francisco Noé Arroyo-López, Beatriz Martínez, Pilar García, Antonio Garrido-Fernández and Ana Rodríguez conceived and designed the experiments; and Eva González-Menéndez performed the experiments; Eva González-Menéndez, Francisco Noé Arroyo-López, Antonio Garrido-Fernández and Ana Rodríguez analyzed the data; Eva González-Menéndez, Francisco Noé Arroyo-López, Beatriz Martínez, Pilar García, Antonio Garrido-Fernández and Ana Rodríguez wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Hennekinne, J.A.; de Buyser, M.L.; Dragacci, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 815–836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* **2016**, *14*, 4634. [[CrossRef](#)]
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *National Outbreak Reporting System (NORS)*; Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Atlanta, GA, USA, 2017.
4. Le Loir, Y.; Baron, F.; Gautier, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* **2003**, *2*, 63–76. [[PubMed](#)]
5. Davis, S.L.; Perri, M.B.; Donabedian, S.M.; Manierski, C.; Singh, A.; Vager, D.; Haque, N.Z.; Speirs, K.; Muder, R.R.; Robinson-Dunn, B.; et al. Epidemiology and outcomes of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 1705–1711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Enright, M.C.; Robinson, D.A.; Randle, G.; Feil, E.J.; Grundmann, H.; Spratt, B.G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7687–7692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Loomba, P.S.; Taneja, J.; Mishra, B. Methicillin and vancomycin resistant *S. aureus* in hospitalized patients. *J. Glob. Infect. Dis.* **2010**, *2*, 275–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Tarai, B.; Das, P.; Kumar, D. Recurrent challenges for clinicians: Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin resistance, and current treatment options. *J. Lab. Physicians* **2013**, *5*, 71–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Suetens, C.; Hopkins, S.; Kolman, J.; Diaz, L.; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Point Prevalence Survey of Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use in European Acute Care Hospitals*; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): Stockholm, Sweden, 2013.
10. Munita, J.M.; Bayer, A.S.; Arias, C.A. Evolving resistance among Gram-positive pathogens. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *61* (Suppl. 2), S48–S57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Kutter, E.; De Vos, D.; Gvasalia, G.; Alavidze, Z.; Gogokhia, L.; Kuhl, S.; Abedon, S.T. Phage therapy in clinical practice: Treatment of human infections. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2010**, *11*, 69–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Cooper, C.J.; Khan Mirzaei, M.; Nilsson, A.S. Adapting drug approval pathways for bacteriophage-based therapeutics. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vandenhevel, D.; Lavigne, R.; Brüssow, H. Bacteriophage Therapy: Advances in Formulation Strategies and Human Clinical Trial. *Annu. Rev. Virol.* **2015**, *2*, 599–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. García, P.; Rodríguez-Rubio, L.; Rodríguez, A.; Martínez, B. Food biopreservation: Promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends Food Sci. Technol.* **2010**, *21*, 373–382. [[CrossRef](#)]
15. Aminov, R.; Caplin, J.; Chanishvili, N.; Coffey, A.; Cooper, I.; de Vos, D.; Doška, J.R.; Friman, V.P.; Kurtböke, I.; Pantůček, R.; et al. Application of bacteriophages. *Microbiol. Aust.* **2017**, *38*, 63–66. [[CrossRef](#)]
16. Gutiérrez, D.; Vandenhevel, D.; Martínez, B.; Rodríguez, A.; Lavigne, R.; García, P. Two Phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, lyse mono- and dual-species staphylococcal biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 3336–3348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kelly, D.; McAuliffe, O.; Ross, R.P.; Coffey, A. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives. *Lett. Appl. Microbiol.* **2012**, *54*, 286–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Alves, D.R.; Gaudion, A.; Bean, J.E.; Perez Esteban, P.; Arnot, T.C.; Harper, D.R.; Kot, W.; Hansen, L.H.; Enright, M.C.; Jenkins, A.T. Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 6694–6703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

19. Lu, T.K.; Bowers, J.; Koeris, M.S. Advancing bacteriophage-based microbial diagnostics with synthetic biology. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 325–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Warner, C.M.; Barker, N.; Lee, S.W.; Perkins, E.J. M13 bacteriophage production for large-scale applications. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2014**, *37*, 2067–2072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Montgomery, D.C. *Design and Analysis of Experiments*, 9th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, NY, USA, 2017; pp. 489–568. ISBN 978-1-119-11347-8.
22. Myers, R.H.; Montgomery, D.C.; Anderson-Cook, C.M. Multiple Response Optimization. In *Response Surface Methodology Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, 4th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2016; pp. 325–368. ISBN 978-1-118-91601-8.
23. Grieco, S.H.; Wong, A.Y.; Dunbar, W.S.; MacGillivray, R.T.; Curtis, S.B. Optimization of fermentation parameters in phage production using response surface methodology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *39*, 1515–1522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gutierrez, D.; Delgado, S.; Vazquez-Sanchez, D.; Martinez, B.; Cabo, M.L.; Rodriguez, A.; Herrera, J.J.; Garcia, P. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *8*, 8547–8554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gutiérrez, D.; Ruas-Madiedo, P.; Martínez, B.; Rodríguez, A.; García, P. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gutiérrez, D.; Martínez, B.; Rodríguez, A.; García, P. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Staphylococcus epidermidis*. *Curr. Microbiol.* **2010**, *61*, 601–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Myers, R.H.; Montgomery, D.C. *Response surface methodology*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, NY, USA, 2002.
28. Pirnay, J.P.; Blasdel, B.G.; Bretaudeau, L.; Buckling, A.; Chanishvili, N.; Clark, J.R.; Corte-Real, S.; Debarbieux, L.; Dublanquet, A.; De Vos, D.; et al. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 2173–2179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Santos, S.B.; Fernandes, E.; Carvalho, C.M.; Sillankorva, S.; Krylov, V.N.; Pleteneva, E.A.; Shaburova, O.V.; Nicolau, A.; Ferreira, E.C.; Azeredo, J. Selection and characterization of a multivalent *Salmonella* phage and its production in a nonpathogenic *Escherichia coli* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 7338–7342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. El Haddad, L.; Ben Abdallah, N.; Plante, P.L.; Dumaresq, J.; Katsarava, R.; Labrie, S.; Corbeil, J.; St-Gelais, D.; Moineau, S. Improving the safety of *Staphylococcus aureus* polyvalent phages by their production on a *Staphylococcus xylosum* strain. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Hyman, P.; Abedon, S.T. Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *501*, 175–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Santos, S.B.; Carvalho, C.; Azeredo, J.; Ferreira, E.C. Population dynamics of a *Salmonella* lytic phage and its host: Implications of the host bacterial growth rate in modelling. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Denes, T.; Wiedmann, M. Environmental responses and phage susceptibility in foodborne pathogens: Implications for improving applications in food safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *26*, 45–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bryan, D.; El-Shibiny, A.; Hobbs, Z.; Porter, J.; Kutter, E.M. Bacteriophage T4 Infection of stationary phase *E. coli*: Life after log from a phage perspective. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kasman, L.M.; Kasman, A.; Westwater, C.; Dolan, J.; Schmidt, M.G.; Norris, J.S. Overcoming the phage replication threshold: A mathematical model with implications for phage therapy. *J. Virol.* **2002**, *76*, 5557–5564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Payne, R.J.; Jansen, V.A. Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 315–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2 Análisis comparativo de diferentes técnicas de conservación y formulación para cuatro fagos de *Staphylococcus*

El uso extensivo de bacteriófagos como agentes antimicrobianos eficaces en el control biológico requiere metodologías mejoradas para su transporte y almacenamiento. Sobre esta base se ha establecido el segundo objetivo de esta Tesis doctoral y se ha estudiado la estabilidad de cuatro fagos de *Staphylococcus* (philPLA88, philPLA35, philPLA-RODI y philPLA-C1C) tras aplicar diferentes técnicas de formulación (lisados, liofilizados y encapsulados), almacenamiento en diferentes condiciones de humedad y temperatura (ambiental, refrigeración y congelación) y utilizando distintos aditivos estabilizantes (disacáridos, glicerol, sorbitol, leche descremada y alginato de calcio). Para ello, se realizaron ensayos que permitieron comparar el título fágico antes y después del proceso de formulación, y durante el almacenamiento bajo distintas condiciones y a lo largo de diferentes períodos de tiempo (desde meses hasta años).

Artículo 2. González-Menéndez, E., Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A., Martínez, B. & García P. (2018). Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products. *PLoS ONE*, 13(10):e0205728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205728>

Contribución personal al trabajo

- Concepción y diseño de los experimentos, junto con el resto de co-autores.
- Experimentación en su totalidad.
- Análisis de los datos, junto con Pilar García y Beatriz Martínez.
- Redacción del manuscrito y elaboración de tablas y figuras, junto con el resto de co-autores del artículo.

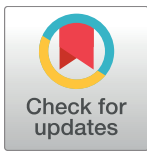
RESEARCH ARTICLE

Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products

Eva González-Menéndez, Lucía Fernández, Diana Gutiérrez, Ana Rodríguez, Beatriz Martínez, Pilar García *

Departamento de Tecnología y Biotecnología de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias—Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias, Spain

* pgarcia@ipla.csic.es



 OPEN ACCESS

Citation: González-Menéndez E, Fernández L, Gutiérrez D, Rodríguez A, Martínez B, García P (2018) Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products. PLoS ONE 13(10): e0205728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205728>

Editor: Krystyna Dąbrowska, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, POLAND

Received: March 21, 2018

Accepted: October 1, 2018

Published: October 11, 2018

Copyright: © 2018 González-Menéndez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research study was supported by grants AGL2015-65673-R (Ministry of Science and Innovation, Spain), GRUPIN14-139 (Program of Science, Technology and Innovation 2013-2017

Abstract

Bacteriophages have been proven as effective antimicrobial agents in the treatment of infectious diseases and in other biocontrol applications including food preservation and disinfection. The extensive use of bacteriophages requires improved methodologies for medium- and long-term storage as well as for easy shipping. To this aim, we have determined the stability of four *Staphylococcus* phages (phiIPLA88, phiIPLA35, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C) with antimicrobial potential at different temperatures (20°C/25°C, 4°C, -20°C, -80°C, -196°C) and during lyophilization (freeze drying) using several stabilizing additives (disaccharides, glycerol, sorbitol and skim milk). Differences between phages were observed at different temperatures (20°C/25°C, 4°C and -20°C), where phages were less stable. At lower temperatures (-80°C and -196°C), all phages showed good viability after 24 months regardless of the stabilizer. Differences between phages were also observed after lyophilization although the addition of skim milk yielded a dry powder with a stable titer after 24 months. As an alternative to facilitate storage and transportation, phage encapsulation has been also explored. Phage phiIPLA-RODI encapsulated in alginate capsules retained high viability when stored at 4°C for 6 months and at 20°C for 1 month. Moreover, the spray-dryer technique allowed obtaining dry powders containing viable encapsulated phages (phiIPLA-RODI and phiIPLA88) in both skim milk and trehalose for 12 months at 4°C. Storage of phages at 20°C was less effective; in fact, phiIPLA88 was stable for at least 12 months in trehalose but not in skim milk, while phiIPLA-RODI was stable only for 6 months in either stabilizer. These results suggest that encapsulated phages might be a suitable way for shipping phages.

and FEDER EU funds, Principado de Asturias, Spain). L.F. is a “Marie Curie Clarin-Cofund” postdoctoral fellow. PG, BM, and AR are members of the FWO Vlaanderen funded “Phagebiotics” research community (WO.016.14) and the bacteriophage network FAGOMA II. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: “The authors have declared that no competing interests exist.”

Introduction

Bacteriophages are the natural enemies of bacteria. Lytic bacteriophages infect specifically a host bacterium and multiply inside the cytoplasm to finally lyse the cell. This antimicrobial property may be used as an alternative to classical antibiotics to treat human infections provoked by multi-resistant bacteria or “super-bugs” [1]. Indeed, there is an urgent need of new antimicrobials as was clearly indicated by the United Nations General Assembly [2]. In addition, there are other areas of application of bacteriophages including animal husbandry, veterinary medicine and agriculture [3]. Moreover, bacteriophages have also been proposed as new tools to improve food safety by controlling pathogenic bacteria in food [4].

Regarding the application of bacteriophages in the treatment and prophylaxis of infectious diseases in animals and humans, there are numerous studies that confirm their effectiveness. For instance, successful results were obtained in murine models of lung [5], wound [6], and gastrointestinal infections [7]. Additionally, phages have been proposed to control foodborne pathogens by reducing colonization by zoonotic bacteria in farms, to remove biofilms from industry equipment and food-contact surfaces, and to inhibit the growth of pathogenic bacteria in foods [8].

Indeed, several phage products for human therapy are available in Eastern European countries (Pyophage and Intestiphage preparations from the Eliava Institute, Tbilisi, Georgia) and products for food-related applications (ListShield™, PhageGuard Listex, EcoShield™ and Salmo-Fresh™) are currently marketed in the USA and Western Europe.

This renewed interest in bacteriophage applications has resulted in a number of *in vitro* studies about preservation and delivery of phages (recently reviewed by [9]). Some preservation techniques such as lyophilization have been used to obtain formulations suitable for clinical application of phages. For example, aerosolizing powders containing bacteriophages KS4-M and FKZ were prepared for lung delivery and treatment of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* infections [10] and lyophilized inserts harboring *Staphylococcus aureus* bacteriophages were used to eradicate MRSA from the nose [11]. Moreover, oral administration of phages requires enhanced resistance to the harsh gastric conditions, which have been solved by microencapsulation of phages in polymeric matrices such as alginate and pectin [12, 13]. Microencapsulation has been recently proposed for obtaining microcapsules containing phages that, once added to a propylene glycol gel, could be used as sanitizers in the food industry [14]. This study concluded that bacteriophage susceptibility to storage and processing conditions differs among phages. Therefore, these parameters should be optimized for each phage in order to guarantee the shelf life of phage-based products and ensure application of the right dosage.

In this context, we are interested in *Staphylococcus* phages and their utilization as antimicrobials to combat *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains are responsible for serious and difficult-to-treat human infections [15]. *S. aureus* is also one of the major bacterial agents causing foodborne diseases in humans due to the production of enterotoxins [16]. Promising results were obtained using phages against *S. aureus* infections in animal models of diabetic foot infections [17], diabetic cutaneous wounds [18], septicemia [19], and chronic osteomyelitis [20]. Several studies have also demonstrated the efficacy of bacteriophages to control *S. aureus* development in several foods such as cheese [21, 22] and milk [23]. Phages are also able to prevent or reduce *S. aureus* biofilm formation [24–26].

In spite of all these studies, only one phage-based product against *Staphylococcus*, Pyophage, has been placed on the market to date. Partly, this is due to the regulatory constraints that surround marketing of phage-based products. In order to overcome these regulatory hurdles,

more research is needed to provide additional evidences regarding the efficacy, safety and shelf-life stability of these preparations. For instance, it is important to determine the optimal storage conditions to ensure long-term phage stability prior to the widespread commercialization of phage-based products.

In this study, we have evaluated the stability of different *Staphylococcus* bacteriophages under different storage conditions over a 24-month period. To do that, we used four phages previously isolated in our laboratory. Two of them, phiIPLA35 and phiIPLA88, were selected as virulent mutants of the *S. aureus* temperate phages Φ A72 and Φ H5, respectively [27, 28]. These bacterial viruses belong to the *Siphoviridae* family and effectively inhibit *S. aureus* growth in dairy products [21, 27, 29, 23]. More recently, we have isolated and characterized two *Myoviridae* phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, infecting a broad range of staphylococcal species [25]. Their high lytic ability against planktonic cultures and biofilms makes them good candidates for removing *Staphylococcus* in both hospital and food-related settings. Our results will be useful for developing an easy and effective methodology to preserve phage stocks that can be later applied after large-scale propagation in an industrial setting. More specifically, we focused on assessing the impact of temperature and presence of a stabilizing agent on phage stability, and explored two encapsulation techniques that would allow shipping and storage without refrigeration. Additionally, we have assessed the efficacy of preparing frozen stocks for phage storage inside infected cells. Although this method would not be suitable for phage delivery to food or phage therapy applications, it would be a convenient technique for preservation of master stocks for industrial production of phages.

Material and methods

Bacterial strains and bacteriophage propagation

Staphylococcus aureus Sa9 was used as the host strain of phages phiIPLA35 and phiIPLA88 [28]. Bacteriophages phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C were propagated on *S. aureus* IPLA1 and *S. epidermidis* F12, respectively [25]. All strains were routinely cultured in tryptic soy broth (TSB; Scharlau, Barcelona, Spain) at 37°C with shaking or on TSB plates containing 2% (w/v) bacteriological agar (TSA). Bacteriophages were propagated as described previously [28, 25]. Briefly, early exponential cultures of *Staphylococcus* host strains ($OD_{600} = 0.1$) were infected with the phage at a multiplicity of infection (MOI) of 1–10. The infected cultures were then incubated for 3 h at 37°C with vigorous shaking. Phage lysates were obtained by centrifugation of cultures and subsequent filtration (0.45 μ m cellulose acetate filters). Partial purification was obtained after precipitation of phage lysates by adding NaCl (0.5 M, final concentration) and PEG 8000 (10%, final concentration). Samples were maintained for 18 h at 4°C, and then centrifuged at 10,000 rpm, 30 min at 4°C. The pellet containing the phages was resuspended in SM buffer (20 mM Tris HCl, 10 mM $MgSO_4$, 10 mM $Ca(NO_3)_2$ and 0.1 M NaCl, pH 7.5).

Phage titer was calculated by the plaque assay following the double-layer technique [30]. Aliquots (0.1 ml) of *Staphylococcus* stationary cultures ($\sim 10^8$ CFU/ml) were mixed with several dilutions of individual phage suspensions in SM buffer and then added to 3 ml of molten TSB top agar (0.7% w/v). This mixture was poured onto TSA plates and incubated for 18 h at 37°C. The assays were performed in triplicate and the results were expressed as PFU/ml. In the culture conditions described above, the titer of phiIPLA35 and phiIPLA88 phage lysates ranged from 10^9 – 10^{10} PFU/ml, whereas phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C lysates showed values of 10^8 – 10^9 PFU/ml.

Preparation of samples for low-temperature storage

Phage lysates were mixed with stabilizers resulting in a final concentration of 0.8 M trehalose, 0.8 M sucrose, 15% glycerol or 11% skim milk, and a final titer ranging from 10^8 to 10^9 PFU/ml. Samples before storage at low temperature were taken as control samples. Cryopreservation vials were filled with 1 ml of the above-mentioned mixtures (phage lysate plus stabilizer) and stored at -20°C , -80°C or -196°C (liquid nitrogen).

In addition, samples containing freshly infected cells were prepared as previously described Golec et al [31], with some modifications. Exponential cultures of the host staphylococcal strains ($\text{OD}_{600} = 0.1$) growing in TSB medium were infected with the appropriate phage at an $\text{MOI} = 5$ and incubated for 15 min at 20°C without shaking. Aliquots of the infected culture were immediately plated to determine the phage titer by the double layer technique. Additionally, samples were stored at -20°C , -80°C and -196°C in the presence of glycerol (15% final concentration).

All samples were stored in triplicate. At 1, 6, 12 and 24 months aliquots were tested for phage titer as described above. Aliquots of phage lysates in TSB without stabilizers were also kept in triplicate at 4°C and $20^\circ\text{C}/25^\circ\text{C}$ and the titer measured at 1, 3 and 6 months.

Lyophilization

Phage lysates were diluted 1:1 (v/v) in 22% skim milk, 1.6 M sucrose or 30% sorbitol and frozen at -80°C in 2 ml vials for 24 h. Freshly infected cells, prepared as indicated above, were centrifuged and suspended in skim milk (11% final concentration) or sucrose (0.8 M final concentration) and immediately frozen at -80°C . Samples were lyophilized using an Alpha 1–4 freeze-dryer (Christ, Osterode am Harz, Germany) and vials were then sealed under vacuum conditions and stored at 4°C . Phage titer was determined by using the double layer technique after reconstitution of each vial with 2 ml of sterile water.

Encapsulation in alginate

Phages were partially purified as described above and then diluted ten-fold in 50 mM HEPES pH 7.5 containing 2% (w/v) sodium alginate (FDA 21 CFR Sigma–Aldrich, USA). Samples were stirred at 500 rpm for 1 h at 20°C . Capsules were formed by dropping the phage suspension with a pipette (3.5 ml, 1 mm diameter, SARSTEDT, Germany) into a 0.1 M CaCl_2 solution with continuous stirring. Alginate capsules were kept in this solution for 30 min at 20°C and then washed four times with milli-Q water and stored at 4°C .

Microcapsules were prepared by emulsification. The internal phase was prepared by adding 2 ml of phage suspensions to 4 ml 50 mM HEPES pH 7.5, and further mixed with sodium alginate to reach a final concentration of 3% (w/v). This solution was stirred for 1 h at 20°C with 3 ml of 30 mM CaCl_2 . The external phase of the emulsion was prepared by mixing 20 ml of Miglyol 812 (Acofarma, Spain) containing 3% (w/v) Span 80 (Sigma–Aldrich, USA) and 50 μl of glacial acetic acid; this phase was stirred for 30 min at 50°C . In order to obtain the microemulsion, the internal and external phases were homogenized at 20,000 rpm for 2 min by using a Heidolph SilentCrusher M (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). 50 μl of glacial acetic acid were added during the homogenization step to improve gelation. Microcapsules size was determined by Dynamic Light Scattering (DLS) using a Malvern Mastersizer S Long Bench (Malvern Instruments, UK).

Triplicate samples of encapsulated and microencapsulated phages were stored at 4°C and $20^\circ\text{C}/25^\circ\text{C}$, and aliquots were taken at 1, 2 and 3 months. Alginate capsules and microcapsules (1 g) containing phage particles were dissolved in 9 ml of 0.1 M sodium citrate for 20 min with shaking, prior to serial dilution. Sodium citrate acts by destabilizing the calcium alginate

structure through exchange of calcium ions for sodium ions [32]. Phage titer was calculated as described above.

Spray-drying

To test the effect of high temperature on phage stability, partially purified phages were diluted in SM buffer, trehalose (15% final concentration) or skim milk (11% final concentration). Samples were incubated for 30 min at different temperatures (40–60°C) and then titrated using the double-layer technique. All assays were performed in triplicate.

Mixtures of phages and stabilizers (trehalose and skim milk) were dried using a LabPlant Spray Dryer SD-05 (Keyson Products, Essex, England). For this purpose, samples (150 ml) were loaded at 40°C a flow rate of 5 ml/min, with airflow of 54 m³/h or 900 l/min (the inlet and outlet air temperature was 170 °C and 120°C, respectively) and compressor air pressure was 0.9 bar. The dried powder was collected and stored at 4°C and 20°C/25°C. Samples containing trehalose were stored in a desiccator with silica gel.

Powder samples containing phages were reconstituted with sterile water to reach the original volume and concentrations of skim milk and trehalose. Serial dilutions were plated for phage titration as described above.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS-PC 23.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA), in order to establish any significant differences in phages titers among the stabilizing additives, storage conditions and time. The differences in phage titers, expressed as the mean \pm standard deviation of three biological replicates in all the assays, were determined by one-way analysis of variance (ANOVA). The Student-Newman-Keuls test was used for a comparison of means at a level of significance of $P < 0.01$ or $P < 0.05$ depending on the experiment.

Results

Low-temperature storage improves preservation of *Staphylococcus* phages

With the aim of finding the most suitable conditions for storage of phages phiIPLA35, phiIPLA88, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, samples were stored in different conditions for 24 months and the titer evaluated along this time.

Phage phiIPLA88 showed good stability at 4°C with a reduction of less than 1 log unit, while the rest of phages were less stable, with reductions of about 3, 2 and 1 log units, for phiIPLAC1C, phiIPLA-RODI and phiIPLA35, respectively (Table 1).

Remarkably, samples stored at 20°C/25°C lost viability after 6 months, as titer declined up to 4.4 log units. Regarding the stability of phages at the different freezing temperatures, siphophages phiIPLA35 and phiIPLA88 showed good stability for all stabilizers, with no major changes in phage titer after 24 months at -20°C (loss of viability < 0.2 log unit). By contrast, when these phages were stored as infected cells, a loss of up to 2.4 log units was observed in the phage titer after 24 months for phage phiIPLA88 (Table 1). A lower stability was observed for myophages phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C at -20°C. Indeed, no lysis plaques were detected in samples stored for 24 months when trehalose or sucrose was used as stabilizers (Table 1). However, phiIPLA-RODI showed greater stability in glycerol than phiIPLA-C1C, retaining a titer of 10⁸ PFU/ml (loss of viability < 0.9 log unit) after 24 months at -20°C, while phiIPLA-C1C showed a titer of about 10⁴ PFU/ml (loss of viability ~ 3.6 unit log). Regarding the myophages stored inside host cells, samples retained a phage titer of about 10³–10⁴ PFU/ml (loss of viability ~ 4 unit log) after 24 months (Table 1).

Table 1. Stability of *Staphylococcus* phages (phiIPLA35, phiIPLA88, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C) stored at different temperatures in TSB without additives, and in the presence of several stabilizing additives.

T ^a	Stabilizing additives	Phage titer reduction			
		phiIPLA35	phiIPLA88	phiIPLA-RODI	phiIPLA-C1C
20°C/25°C	TSB	2.61±0.27*	1.98±0.37*	4.30±0.23*	4.41±0.16*
4°C	TSB	1.10±0.05*	0.33±0.02*	2.28±0.01*	2.94±0.03*
-20°C	0.8 M Trehalose	0.09±0.01	0.10±0.09	-*	-*
	0.8 M Sucrose	0.17±0.03*	0.20±0.02*	-*	-*
	15% Glycerol	0.02±0.08	0.00±0.06	0.81±0.08*	3.60±0.00*
	11% Skim milk	0.08±0.01	0.08±0.09	2.97±0.08*	3.45±0.07*
	Infected cells	0.90±0.39*	2.35±0.58*	4.06±0.26*	3.61±0.27*
-80°C	0.8 M Trehalose	0.18±0.12	0.09±0.08	0.00±0.07	0.45±0.07*
	0.8 M Sucrose	0.07±0.01	0.07±0.07	0.02±0.13	0.47±0.08*
	15% Glycerol	0.23±0.01*	0.18±0.01	0.64±0.06*	0.29±0.10*
	11% Skim milk	0.05±0.05	0.08±0.11	0.03±0.10	0.02±0.05
	Infected cells	0.89±0.35*	0.92±0.46*	1.02±0.05*	0.68±0.08*
-196°C	0.8 M Trehalose	0.42±0.02*	0.33±0.07*	0.29±0.11*	1.31±0.10*
	0.8 M Sucrose	0.47±0.17*	0.28±0.08*	0.48±0.07*	1.06±0.05*
	15% Glycerol	0.19±0.04	0.21±0.05	0.24±0.06	1.04±0.24*
	11% Skim milk	0.22±0.01	0.34±0.10*	0.24±0.06*	1.20±0.03*
	Infected cells	0.59±0.23	0.93±0.33*	0.52±0.09*	1.23±0.31*

Note: The results, depicted as loss of phage viability, were calculated by the following expression: Mean log₁₀ phage titer reduction = log₁₀ [Initial phage titer (PFU/ml)/ Final phage titer (PFU/ml)] ± standard deviation of three biological replicates. Storage during 24 months (4°C, -20°C and -80°C), 12 months (-196°C) and 6 months (20°C/25°C).

(*) The asterisk indicates a significantly different final phage titer compared with the initial phage titer, determined by S-N-K test (P<0.01). (-) Below the bacteriophage detection threshold (10² PFU/ml).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205728.t001>

The results shown in Table 1 suggest that phage titers were not substantially reduced in samples stored at -80°C after 24 months, regardless of the stabilizer used. Thus, the reductions were always below 1 log unit after 24 months for both siphophages and myophages. Similar results were observed for samples stored in liquid nitrogen after 12 months. They all maintained a high stability with the exception of phiIPLA-C1C (Table 1), for which the phage titer reduction was about 1–1.4 log units in the presence of all stabilizers.

Lyophilization in skim milk is an alternative for phage storage

Looking for an alternative for long-term storage, phage lysates were freeze-dried in the presence of three stabilizers (skim milk, sucrose and sorbitol) and then stored at 4°C for 24 months. The results showed that sorbitol possessed a poor stabilizing activity for siphophages with phage titer losses of about 4.3 log units for phage phiIPLA35 (Fig 1A). However, samples corresponding to siphophages stored in skim milk retained their infectivity with a phage titer loss lower than 1 log unit. In the case of myophages, the three stabilizers conferred similar protection during lyophilization and storage (Fig 1C and 1D). Remarkably, lyophilization caused a high loss of infectivity for phage phiIPLA-C1C regardless of the stabilizer used, with reductions of 2 log units one month after the lyophilization process (Fig 1D), whereas phiIPLA-RODI showed very good stability in all cases.

As an additional method for stabilization of phages during the lyophilization process, freshly infected cells were suspended in skim milk or sucrose and further freeze-dried. Overall, protection of phages inside the infected cells proved to be an effective system to avoid the

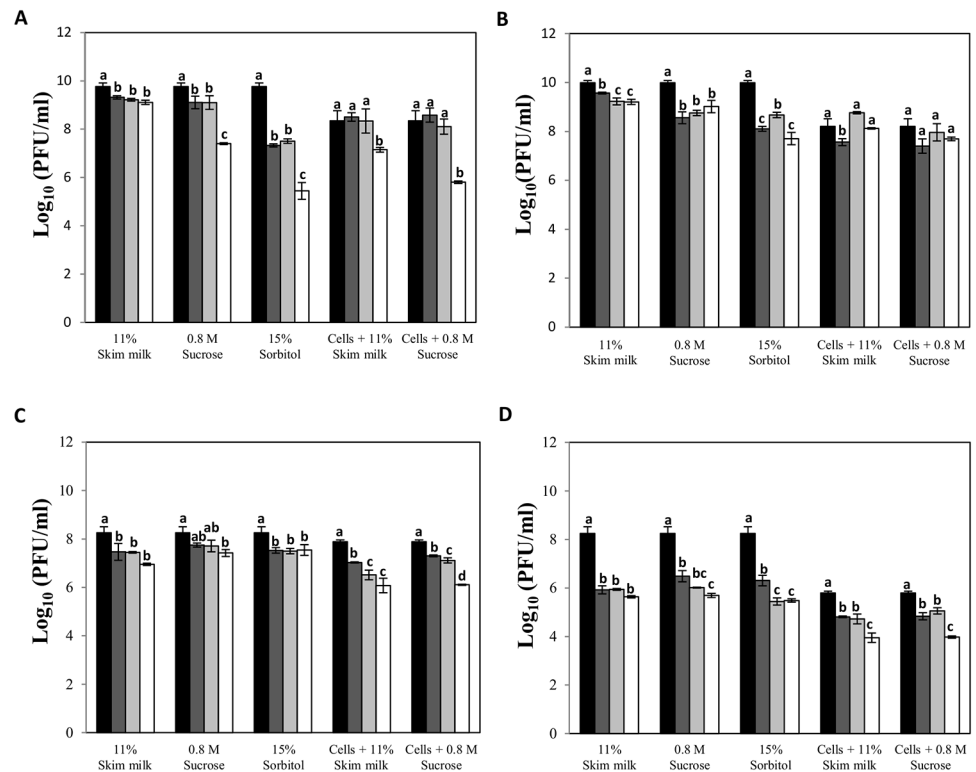


Fig 1. Stability of *Staphylococcus* phages during lyophilization and subsequent storage. Phages phiIPLA35 (A), phiIPLA88 (B), phiIPLA-RODI (C) and phiIPLA-C1C (D) in different additives before lyophilization (black bars), and after storage at 4°C during: 1 month (dark grey bars), 6 months (light grey bars) and 24 months (white bars). Stability of phages was expressed as the titer of samples along time. Bars represent mean ± standard deviation of phage titer obtained from three biological replicates. Different letters were significantly different in S-N-K test (P < 0.01).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205728.g001>

detrimental effects of the process, especially for phiIPLA-C1C since the reduction in phage titer during lyophilization was lower than those observed in other samples, i.e. the difference in phage titer between samples before and after lyophilization was 1.0 log unit, whereas using skim milk as protective the decrease reaches 2.3 log units (Fig 1D). However, higher protection was not observed along the 24 months storage period, with the exception of phiIPLA88. In samples containing infected cells, we did not observe a decrease in phage titer in comparison with the initial titer after 24 months of storage, whereas a decrease of 2.3 log units was observed for samples stored in sorbitol (Fig 1B).

***Staphylococcus* phages retain their viability in alginate microcapsules**

Stability of phages during alginate encapsulation and microencapsulation processes and subsequent storage at 4°C and 20°C was evaluated. Capsules with an average diameter size of 5 mm and microcapsules with an average diameter size of 129 µm were obtained. The phage titer calculated just after the encapsulation process was about 10⁶ PFU/ml, with the exception of capsules containing phiIPLA-C1C (Table 2).

The storage of alginate capsules containing phiIPLA-RODI at 4°C retained the phage titer for 3 months, and this was 5.74±0.4 log units (PFU/ml) even after 6 months (data not shown). By contrast, capsules stored at 20°C maintained phiIPLA-RODI stability for 2 months with a reduction of 2.5 log units during this storage period (Table 2). The other phages were less stable at 20°C. Overall, a higher stability was observed at refrigeration temperature than at 20°C.

Table 2. Encapsulation of *Staphylococcus* phages in alginate.

Bacteriophage	Storage conditions	Calcium alginate capsules				Calcium alginate microcapsules				SM buffer		
		After process	1 month	2 months	3 months	After process	1 month	2 months	3 months	Initial	1 month	3 months
phiIPLA35 Log ₁₀ (PFU/ml)	4°C	6.7±0.5	5.3±0.5	4.1±0.5	2.8±0.5	7.0±0.1	6.8±0.1	6.7±0.1	6.4±0.2	9.4±0.1	9.4±0.0	9.3±0.1
	20°C	6.7±0.5	-	-	-	7.0±0.1	3.4±0.1	2.0±0.7	-	9.4±0.1	9.4±0.0	8.5±0.0
phiIPLA88 Log ₁₀ (PFU/ml)	4°C	6.8±0.5	5.8±0.1	4.9±0.1	3.9±0.3	7.1±0.2	6.8±0.1	6.7±0.1	6.7±0.1	9.8±0.1	9.7±0.0	9.6±0.0
	20°C	6.8±0.5	4.1±1.1	-	-	7.1±0.2	3.9±0.1	2.4±1.2	-	9.8±0.1	9.6±0.0	8.9±0.1
phiIPLA-RODI Log ₁₀ (PFU/ml)	4°C	6.7±0.3	6.2±0.2	6.1±0.4	5.9±0.4	6.2±0.1	5.4±0.1	5.4±0.1	5.1±0.1	8.2±0.1	8.0±0.1	7.3±0.1
	20°C	6.0±0.1	5.1±0.1	3.5±0.2	-	6.2±0.1	4.2±0.3	3.1±1.1	-	8.2±0.1	7.7±0.0	6.6±0.0
phiIPLA-C1C Log ₁₀ (PFU/ml)	4°C	5.4±0.2	3.9±0.4	-	-	5.3±0.1	4.9±0.1	4.5±0.1	3.7±0.4	8.7±0.0	8.3±0.2	7.7±0.1
	20°C	5.4±0.2	-	-	-	5.3±0.1	3.4±1.2	2.7±0.2	-	8.7±0.0	7.7±0.4	7.3±0.4

Phage titer of phages (phiIPLA35, phiIPLA88, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C) after alginate encapsulation and microencapsulation processes, in SM buffer and subsequent storage at 4°C and 20°C/25°C. Note: (-) below the bacteriophage detection threshold (10² PFU/mL).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205728.t002>

On the other hand, microencapsulation in alginate conferred higher stability to phages compared with standard encapsulation. Thus, only about 1–1.5 units log reduction was observed after three months at refrigeration temperature. By contrast, no viable phages were detected beyond two months at 20°C (Table 2).

PhiIPLA88 and phiIPLA-RODI can be stored as dry powder at 20°C

Prior to determining the effect of the spray-dryer process on phage viability, we studied the resistance of phages phiIPLA88 and phiIPLA-RODI at high temperatures in the presence of three additives (SM buffer, skim milk and trehalose). PhiIPLA88 turned out to be quite stable at 50°C and samples even maintained a titer of 10⁵ PFU/ml after 30 min at 60°C in trehalose and SM buffer (Fig 2A). Similar results were observed for phiIPLA-RODI at 40°C and

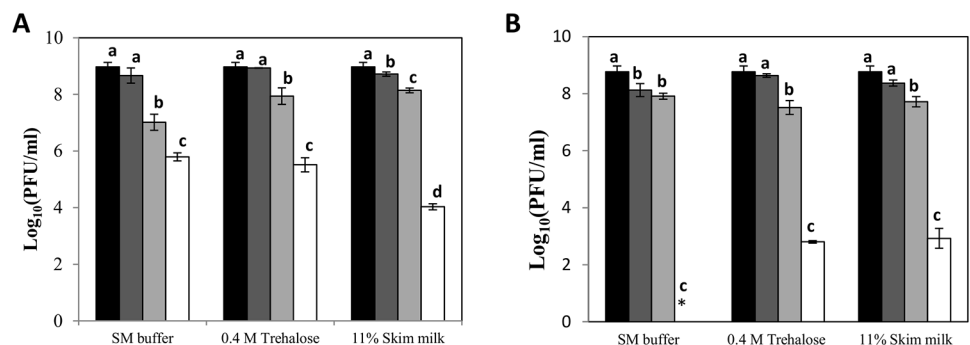


Fig 2. Protective effect of different stabilizers on thermal inactivation of phages. Bacteriophages phiIPLA88 (A) and phiIPLA-RODI (B), were incubated at different temperatures: 4°C (black bars), 40°C (dark grey bars), 50°C (light grey bars) and 60°C (white bars), during 30 min. Phage stability under these conditions was measured as the variation in phage titer after treatment. Bars represent mean ± standard deviation of phage titer in three biological replicates. Different letters were significantly different in S-N-K test (P<0.05). Asterisk (*): Below the bacteriophage detection threshold (10² PFU/ml).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205728.g002>

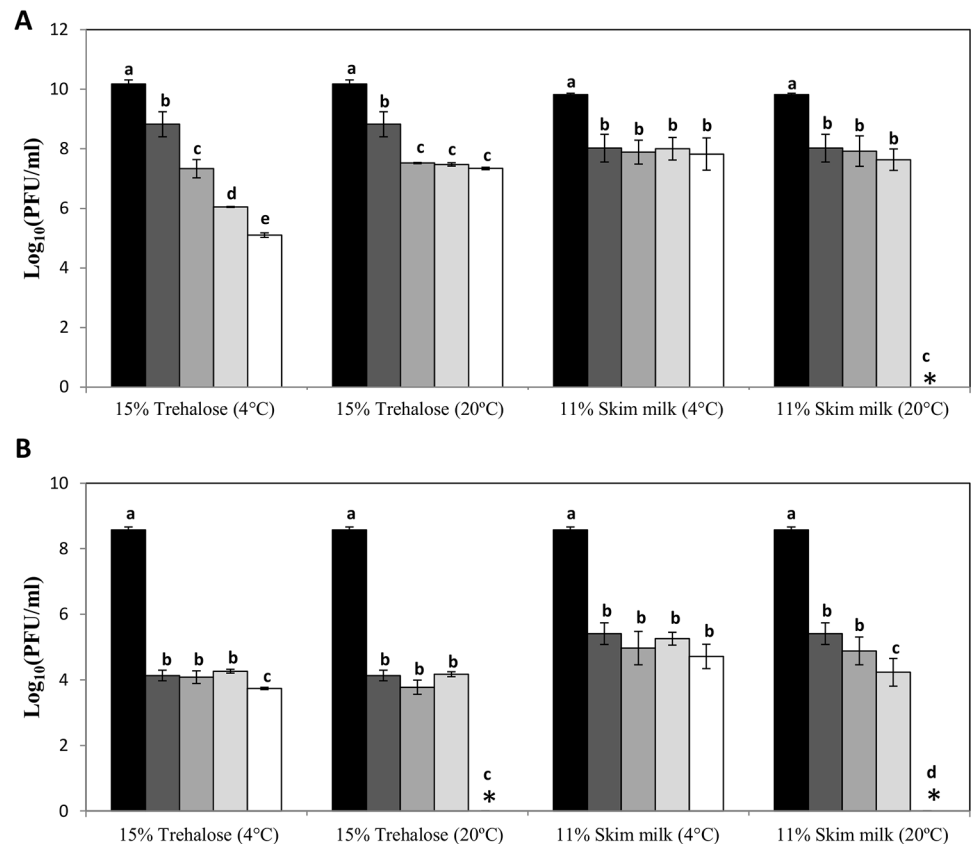


Fig 3. Evolution of phage titer after spray-drying process. Phages phiIPLA88 (A) and phiIPLA-RODI (B), before process (black bars), immediately after process (dark grey bars), and stored 1 month (grey bars), 6 months (light grey bars) and 12 months (white bars), at different temperatures and with different stabilizing additives. Bars represent mean \pm standard deviation of phage titer in three biological replicates. Different letters were significantly different in S-N-K test ($P < 0.05$). Asterisk (*): Below the bacteriophage detection threshold (10^2 PFU/ml).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205728.g003>

50°C, but titers were reduced by 6 log units at 60°C in the presence of trehalose and skim milk (Fig 2B).

Based on these results, suspensions containing phiIPLA88 and phiIPLA-RODI were spray dried using skim milk and trehalose as stabilizers at 40°C as temperature for loading the samples. The resulting powders were stored at 4°C or 20°C. The samples were titrated immediately after the process and throughout 12 months (Fig 3).

A reduction of 1–2 log units was observed for phiIPLA88 in trehalose and skim milk immediately after the process (Fig 3A), whereas phiIPLA-RODI showed a greater loss of viability in both stabilizers (up to 4 log units) (Fig 3B). Regarding storage, phiIPLA88 turned out to be more stable and retained a titer of 10^7 – 10^8 PFU/ml after storage for 12 months at 20°C in samples containing trehalose as a stabilizing agent and also in samples stored at 4°C in the presence of skim milk. Unexpectedly, storage at 4°C decreased the phage phiIPLA88 titer in the presence of trehalose. Finally, despite the lower stability during the process, phiIPLA-RODI also maintained infectivity at 20°C for six months and at refrigeration temperature for 12 months regardless of the stabilizer (Fig 3B).

Discussion

Commercialization of bacteriophage-based products is expected to increase over the next few years due to the implementation of phage therapy to overcome the global antibiotic resistance

crisis [33]. In fact, several clinical trials using bacteriophages to treat infectious diseases in humans have been undertaken [34–37], and it is also possible that food industries will incorporate these products in their routine disinfection procedures [38]. In this context, it is still necessary to optimize phage storage conditions for both small stocks intended preserve phages over prolonged periods of time and, large volumes of purified phages ready for delivery. Accordingly, this study compares the stability of small stocks of four *Staphylococcus* phages over a 24-month period using three preservation techniques (low temperature, lyophilization and encapsulation).

Low-temperature preservation techniques have been widely used to maintain phage stocks during long-term periods [39]. They have the advantage of being affordable for most laboratories although the main drawback is their associated energy cost and their unsuitability for large volumes. Here, we have shown a clear relationship between storage temperature and phage stability, which was particularly evident for phages belonging to the *Myoviridae* family. Thus, phage stability increased as storage temperature decreased. In fact, we observed that the reduction in phage titer was less than 1.5 log units after 12 months at -196°C , regardless of the phage and the stabilizer used. Obviously, this technique is only useful for preservation of small volumes of master stock. The results obtained at -80°C were similar, suggesting that phages from both families can be preserved at this temperature in any stabilizer for long-term storage (at least 2 years).

Some differences in stability between the two phage families were detected at -20°C . Previous studies indicate that the phage titer reductions observed in frozen samples stored at -20°C is mainly related with the formation of large ice crystals [9]. Our results suggest that this effect was more pronounced for phages belonging to the *Myoviridae* family despite the presence of stabilizers. More specifically, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C were relatively unstable in the presence of trehalose and sucrose, disaccharides that are commonly used for the cryopreservation of microorganisms [40]. By contrast, it is worth noticing the protective effect of skim milk and glycerol at this temperature. Indeed, glycerol showed a good efficacy for phiIPLA-RODI preservation. One possible explanation is that the cryopreservation effect of disaccharides is lost during the slow freezing [41].

Regarding the preparation of master stocks to be used for industrial phage productions, in general, storage in infected cells did not provide enhanced protection compared with naked phages. Overall, our results suggest a lesser effectiveness of this method for our staphylococcal phages than was previously observed for *S. aureus* phages A5W and phiAGO1.3, in which no titer reduction was detected [31]. These differences could be attributed to the longer storage time and the higher temperature (-20°C) at which our phages were subjected compared with A5W and phiAGO1.3. In addition, the differences in the specific conditions used for obtaining infected cells (MOI, time for adsorption, washing steps after infection) cannot be ruled out as an additional cause of the lower phage viability observed in our phages.

For long-term preservation of *Staphylococcus* phages we also explored lyophilization, which has been proven efficient for other bacteriophages [42, 10, 11, 43, 44]. Although specific equipment is required for sample preparation, this method offers the advantage of producing a dry powder that can be easily stored and shipped. After lyophilization, samples containing phages were stored at 4°C to avoid the instability previously observed for some bacteriophages in powders containing trehalose due to matrix crystallization [45]. Skim milk provided good protection along 24 months for all the phages studied, although a notable reduction in phage titer occurred for phiIPLA-C1C during the lyophilization process. Studies about stability of other *Myoviridae* phages such as the *S. aureus* phage ISP also confirmed the sensitivity of these phages to the lyophilization process and showed disaccharides trehalose and sucrose as effective stabilizers [44]. In this context, Puapermpoonsiri et al. [42] found that the stability of

lyophilized bacteriophages is clearly dependent of the moisture content of the powder, the optimal being in a range of 4–6%.

Microencapsulation of bacteriophages is a technology mainly explored to protect phages from the acidic environment found in the gastrointestinal tract when these phages are used in treatment of human or animal infections [46, 47]. Here, we evaluated the use of alginate encapsulated phages to improve their stability under storage and shipping conditions. Our results showed that microencapsulated phages could be maintained at 20°C for 2 months, which facilitates transportation of the samples. For long-term storage, however, microencapsulation did not result in improved phage viability compared with the viability obtained with low temperature (including refrigeration) and lyophilization methods. Of note, microencapsulation techniques have an extra cost that should be evaluated depending on final application. In spite of this, their higher resistance to environmental conditions might compensate for these drawbacks. A variant of the microencapsulation technique, using microfluidic devices, has been recently used to produce calcium alginate capsules containing the bacteriophage UFV-AREG1, which is applied in the sanitization of food surfaces [14]. Similarly, this technique was used for encapsulation of the *Clostridium difficile* bacteriophage CDKM9 intended for treatment of colon diseases [48].

Looking for a less harmful strategy to maintain phage viability, and considering its feasibility to be adapted to industrial scale with continuous production, we evaluated the spray drying technique. The need to use high temperatures to dry phage suspensions implies the imperative use of protective compounds to avoid denaturing of phage proteins. For this purpose, both trehalose and skim milk were selected as they have shown the capacity to protect proteins from denaturation [49, 50]. Our results showed a higher stability of phiIPLA88 compared to that of phiIPLA-RODI in both stabilizers. Moreover, reductions in phage titer observed after the drying process were similar to those described for the *Staphylococcus* myophage Romulus subjected to a similar process using trehalose [51]. Definitely, further optimization of the spray-drying process is necessary to reduce the decline in viability caused by the hot air used to dry the phage suspension. For instance, the use of a low-temperature spray-drying system allows obtaining an inhalable powder containing phages to treat pulmonary infections [52, 53]. In this context, it has already been reported that bacteriophages belonging to different families behave differently when subjected to aerosolization [54]. Future work is required to explore other stabilizers, whose characteristics would not only allow long-term storage of phage suspensions but also their direct delivery in applications such as phage therapy or biocontrol.

Acknowledgments

This research study was supported by grants AGL2015-65673-R (Ministry of Science and Innovation, Spain), GRUPIN14-139 (Program of Science, Technology and Innovation 2013–2017 and FEDER EU funds, Principado de Asturias, Spain). L.F. is a “Marie Curie Clarin-Cofund” postdoctoral fellow. PG, BM, and AR are members of the FWO Vlaanderen funded “Phagebiotics” research community (WO.016.14) and the bacteriophage network FAGOMA II. We thank NANOEX Biotechnologies S.L. for collaborating in this work. We also thank Dr Susana Luque (University of Oviedo) for advising on spray-drying technology.

Author Contributions

Conceptualization: Ana Rodríguez, Beatriz Martínez, Pilar García.

Formal analysis: Pilar García.

Investigation: Eva González-Menéndez, Lucía Fernández, Diana Gutiérrez.

Methodology: Diana Gutiérrez.

Supervision: Pilar García.

Validation: Pilar García.

Writing – original draft: Ana Rodríguez, Pilar García.

Writing – review & editing: Beatriz Martínez, Pilar García.

References

1. Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L, Kuhl S, et al. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010; 11:69–86. PMID: [20214609](#)
2. United Nations. Press Release: High-Level Meeting on Antimicrobial Resistance. 2016; [cited 2017, Mar 29]. URL: <https://www.un.org/pga/71/2016/09/21/press-release-hl-meeting-on-antimicrobial-resistance/>
3. Monk AB, Rees CD, Barrow P, Hagens S, Harper DR. Bacteriophage applications: where are we now? *Lett Appl Microbiol*. 2010; 51:363–369. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02916.x> PMID: [20796209](#)
4. García P, Rodríguez L, Rodríguez A, Martínez B. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends Food Sci Technol*. 2010; 21:373–382.
5. Waters EM, Neill DR, Kaman B, Sahota JS, Clokie MRJ, Winstanley C et al. Phage therapy is highly effective against chronic lung infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *Thorax*. 2017; 72:666–667. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209265> PMID: [28265031](#)
6. Regeimbal JM, Jacobs AC, Corey BW, Henry MS, Thompson MG, Pavlicek RL, et al. Personalized therapeutic cocktail of wild environmental phages rescues mice from *Acinetobacter baumannii* wound infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016; 60, 5806–5816. <https://doi.org/10.1128/AAC.02877-15> PMID: [27431214](#)
7. Lee CY, Kim SJ, Park BC, Han JH. Effects of dietary supplementation of bacteriophages against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 on clinical symptoms of post-weaning pigs challenged with the ETEC pathogen. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2016; 101:88–95.
8. Sillankorva SM, Oliveira H, Azeredo J. Bacteriophages and their role in food safety. *Int J Food Microbiol*. 2012; 2012:863945.
9. Malik DJ, Sokolov IJ, Vinner GK, Mancuso F, Cinquerrui S, Vladislavljjevic GT, et al. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv Colloid Interface Sci*. 2017; 249:100–133. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014> PMID: [28688779](#)
10. Golshahi L, Lynch KH, Dennis JJ, Finlay WH. *In vitro* lung delivery of bacteriophages KS4-M and PhiKZ using dry powder inhalers for treatment of *Burkholderia cepacia* complex and *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J Appl Microbiol*. 2011; 110:106–117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04863.x> PMID: [20875034](#)
11. Alfadhel M, Puapermpoonsiri U, Ford SJ, McInnes FJ, Van der Walle CF. Lyophilized inserts for nasal administration harboring bacteriophage elective for *Staphylococcus aureus*: in vitro evaluation. *Int J Pharm* 2011; 416:280–287. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.07.006> PMID: [21771648](#)
12. Dini C, Islan GA, De Urza PJ, Castro GR. Novel biopolymer matrices for microencapsulation of phages: enhanced protection against acidity and protease activity. *Macromol Biosci*. 2012; 12:1200–1208. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200109> PMID: [22847825](#)
13. Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, Arifnez-Soriano J, Cortés P, Maspoch D, et al. Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Sci Rep*. 2017; 25:41441.
14. Boggione DMG, Batalha LS, Gontijo MTP, Lopez MES, Teixeira AVNC, Santos IJB, et al. Evaluation of microencapsulation of the UFV-AREG1 bacteriophage in alginate-Ca microcapsules using microfluidic devices. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017; 158:182–189. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.045> PMID: [28692873](#)
15. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998; 339:520–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806> PMID: [9709046](#)
16. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*. 2003; 2:63–76. PMID: [12917803](#)
17. Chhibber S, Kaur T, Sandeep K. Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: effective treatment in eliminating methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from diabetic foot infections. *PLoS One*. 2013; 8(2):e56022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056022> PMID: [23418497](#)

18. Mendes JJ, Leandro C, Corte-Real S, Barros R, Cavaco-Silv P, Melo-Cristino J, et al. Wound healing potential of topical bacteriophage therapy on diabetic cutaneous wounds. *Wound Repair Regen.* 2013; 21:595–603. <https://doi.org/10.1111/wrr.12056> PMID: 23755910
19. Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Osanai M, Morimoto N, Asagiri T, Ujihara T, et al. Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by *Staphylococcus aureus* in mice. *Microbes Infect.* 2014; 16:512–517. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.02.011> PMID: 24631574
20. Kishor C, Mishr RR, Saraf SK, Kumar M, Srivastav AK, Nath G. Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model. *Indian J Med Res.* 2016; 143:87–94. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.178615> PMID: 26997019
21. Bueno E, García P, Martínez B, Rodríguez A. Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. *Int J Food Microbiol.* 2012; 158:23–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.012> PMID: 22795798
22. El Haddad L, Ben Abdallah N, Plante PL, Dumaresq J, Katsarava R, Labrie S, et al. Improving the safety of *Staphylococcus aureus* polyvalent phages by their production on a *Staphylococcus xyloso* strain. *PLoS One.* 2014; 9:e102600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102600> PMID: 25061757
23. Obeso JM, García P, Martínez B, Arroyo-López FN, Garrido-Fernández A, Rodríguez A. Use of logistic regression for prediction of the fate of *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk in the presence of two lytic phages. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76:6038–6046. <https://doi.org/10.1128/AEM.00613-10> PMID: 20656872
24. Alves DR, Gaudion A, Bean JE, Perez Esteban P, Arnot TC, Harper DR, et al. Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80:6694–6703. <https://doi.org/10.1128/AEM.01789-14> PMID: 25149517
25. Gutiérrez D, Vandenheuvel D, Martínez B, Rodríguez A, Lavigne R, García P. Two Phages, philPLA-RODI and philPLA-C1C, lyse mono- and dual-species staphylococcal biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81:3336–3348. <https://doi.org/10.1128/AEM.03560-14> PMID: 25746992
26. Kelly D, McAuliffe O, Ross RP, Coffey A. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives. *Lett Appl Microbiol.* 2012; 54:286–291. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03205.x> PMID: 22251270
27. García P, Madera C, Martínez B, Rodríguez A. Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *Int Dairy J.* 2007; 17:7.
28. García P, Martínez B, Obeso JM, Lavigne R, Lurz R, Rodríguez A. Functional genomic analysis of two *Staphylococcus aureus* phages isolated from the dairy environment. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75:7663–7673. <https://doi.org/10.1128/AEM.01864-09> PMID: 19837832
29. García P, Madera C, Martínez B, Rodríguez A, Suárez JE. Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. *J Dairy Sci.* 2009; 92:3019–3026. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1744> PMID: 19528579
30. Adams MH. Enumeration of bacteriophage particles. *Bacteriophages.* London: Interscience Publishers, Ltd. 1959; 27–34.
31. Golec P, Dabrowski K, Hejnowicz MS, Gozdek A, Los JM, Wegrzyn G, et al. A reliable method for storage of tailed phages. *J Microbiol Methods.* 2011; 84:486–489. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.007> PMID: 21256885
32. Smidsrød O, Skjåk-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* 1990; 8(3):71–8. PMID: 1366500
33. Nagel TE, Chan BK, De Vos D, El-Shibiny A, Kang'ethe EK, Makumi A et al. The Developing World Urgently Needs Phages to Combat Pathogenic Bacteria. *Front. Microbiol.* 2016; 7:882. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00882> PMID: 27375602
34. Wright A, Hawkins CH, Änggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol.* 2009; 34:349–357. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x> PMID: 19673983
35. Rose T, Verbeken G, De Vos D, Merabishvili M, Vaneechoutte M, Jennes S, et al. Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps. *Int J Burn Trauma.* 2014; 4:66–73.
36. Fish R, Kutter E, Wheat G, Blasdel B, Kutateladze M, Kuhl S. Bacteriophage treatment of intransigent diabetic toe ulcers: a case series. *J Wound Care.* 2016; 25:27–33.
37. Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, Moine D, Descombes P, Charton F, et al. Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh. *EBioMedicine.* 2016; 4:124–137. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.12.023> PMID: 26981577

38. Gutiérrez D, Rodríguez-Rubio L, Martínez B, Rodríguez A, García P. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Front Microbiol.* 2016; 7:825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00825> PMID: 27375566
39. Ackermann HW, Tremblay D, Moineau S. Long-term bacteriophage preservation. *World Federation for Culture Collections Newsletter.* 2004; 38:35–40.
40. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 2003; 46:205–229. PMID: 12818211
41. Uchida T, Takeya S, Nagayama M, and Gohara K. Freezing properties of disaccharide solutions: inhibition of hexagonal ice crystal growth and formation of cubic ice. 2012. In: Borisenko E, editors. *Crystallization and Materials Science of Modern Artificial and Natural Crystals.* London: InTech. 2012. pp. 203–224.
42. Puapermpoonsiri U, Ford SJ, Van der Walle CF. Stabilization of bacteriophage during freeze drying. *Int J Pharm.* 2010; 389:168–175. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.01.034> PMID: 20105458
43. Dini C, De Urreza PJ. Effect of buffer systems and disaccharides concentration on Podoviridae coliphage stability during freeze drying and storage. *Cryobiology.* 2013; 66:339–342. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.03.007> PMID: 23537872
44. Merabishvili M, Vervae C, Pirnay JP, De Vos D, Verbeken G, Mast J, et al. Stability of *Staphylococcus aureus* phage ISP after freeze-drying (lyophilization). *PLoS One.* 2013; 8:e68797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068797> PMID: 23844241
45. Vandenhuevel D, Meeus J, Lavigne R, Van den Mooter G. Instability of bacteriophages in spray-dried trehalose powders is caused by crystallization of the matrix. *Int J Pharm.* 2014; 472(1–2):202–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.026> PMID: 24950368
46. Ma Y, Pacan JC, Wang Q, Xu Y, Huang X, Korenevsky A, et al. Microencapsulation of bacteriophage felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74:4799–4805. <https://doi.org/10.1128/AEM.00246-08> PMID: 18515488
47. Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, Cortes P, MasPOCH D, Llagostera M. Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81:4841–4849. <https://doi.org/10.1128/AEM.00812-15> PMID: 25956778
48. Vinner GK, Vladisavljević GT, Clokie MRJ, Malik DJ. Microencapsulation of *Clostridium difficile* specific bacteriophages using microfluidic glass capillary devices for colon delivery using pH triggered release. *PLoS One.* 2017; 12(10):e0186239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186239> PMID: 29023522
49. Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61:3592–3597. PMID: 7486995
50. Font de Valdez G, Savoy de Giori G, Pesce de Ruiz Holgado A, Oliver G. Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology.* 1983; 20:560–566. PMID: 6194937
51. Vandenhuevel D, Singh A, Vandersteegen K, Klumpp J, Lavigne R, Van den Mooter G. Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013; 84:578–582. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.12.022> PMID: 23353012
52. Matinkhoo S, Lynch KH, Dennis JJ, Finlay WH, Vehring R. Spray-dried respirable powders containing bacteriophages for the treatment of pulmonary infections. *J Pharm Sci.* 2011; 100:5197–5205. <https://doi.org/10.1002/jps.22715> PMID: 22020816
53. Leung SS, Parumasivam T, Gao FG, Carter EA, Carrigy NB, Vehring R, et al. Effects of storage conditions on the stability of spray dried, inhalable bacteriophage powders. *Int J Pharm.* 2017; 521:141–149. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.060> PMID: 28163231
54. Turgeon N, Toulouse MJ, Martel B, Moineau S, Duchaine C. Comparison of five bacteriophages as models for viral aerosol studies. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80:4242–4250. <https://doi.org/10.1128/AEM.00767-14> PMID: 24795379

3 Estudio y mejora de la estabilidad del bacteriófago philPLA-RODI en diferentes condiciones de temperatura, pH, salinidad y presencia de desinfectantes químicos

Las propiedades antimicrobianas de los bacteriófagos los convierten en herramientas adecuadas para su uso como bioconservantes de alimentos o desinfectantes de superficies. No obstante, previamente se requiere del desarrollo de estrategias que aseguren la estabilidad de las partículas fágicas durante el procesamiento de alimentos o tras su exposición a otros desinfectantes. Por tanto, el tercer y último objetivo de esta Tesis doctoral fue evaluar la estabilidad de philPLA-RODI frente a varios factores ambientales relacionados con el entorno alimentario.

Se estudiaron tres tipos de nanovesículas (niosomas, liposomas y/o transferosomas) y se analizaron qué formulaciones proporcionaban un mayor porcentaje de encapsulación y estabilidad del fago, además de su efecto protector frente a factores como temperatura, pH, y presencia de sales.

Además, se estudió la existencia de interacciones sinérgicas o antagónicas entre philPLA-RODI y cuatro desinfectantes utilizados en el sector alimentario (cloruro de benzalconio, triclosán, clorhexidina y peróxido de hidrógeno). Se analizó en qué concentraciones tales desinfectantes podrían afectar a la viabilidad del bacteriófago, así como su eficacia para la eliminación de bacterias patógenas a la hora de utilizarlos conjuntamente.

Artículo 3. González-Menéndez, E., Fernández, L., Gutiérrez, D., Pando, D., Martínez, B., Rodríguez, A. & García P. (2018). Strategies to Encapsulate the *Staphylococcus aureus* Bacteriophage philPLA-RODI. *Viruses*, 10(9), 495. <https://doi.org/10.3390/v10090495>

Contribución personal al trabajo

- Concepción y diseño de los experimentos, junto con el resto de co-autores.
- Experimentación en su totalidad.
- Análisis de los datos, junto con Pilar García.
- Redacción del manuscrito y elaboración de tablas y figuras, junto con el resto de co-autores del artículo.

Resultados


Artículo 4. Agún, S., Fernández, L., González-Menéndez, E., Martínez, B., Rodríguez, A. & García P. (2018). Study of the Interactions Between Bacteriophage phiIPLA-RODI and Four Chemical Disinfectants for the Elimination of *Staphylococcus aureus* Contamination. *Viruses*, 10(3), 103. <https://doi.org/10.3390/v10030103>

Contribución personal al trabajo

- Concepción y diseño de los experimentos: Pilar García, Ana Rodríguez, Beatriz Martínez y Lucía Fernández.
- Experimentación: junto con Seila Agún y Lucía Fernández.
- Análisis de los datos: junto con Seila Agún y Lucía Fernández.
- Redacción del manuscrito y elaboración de tablas y figuras, junto con el autor y resto de co-autores del artículo.

Article

Strategies to Encapsulate the *Staphylococcus aureus* Bacteriophage phiIPLA-RODI

Eva González-Menéndez ¹, Lucía Fernández ¹, Diana Gutiérrez ¹, Daniel Pando ²,
Beatriz Martínez ¹ , Ana Rodríguez ¹ and Pilar García ^{1,*}

¹ Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Spain; eva.gm@ipla.csic.es (E.G.-M.); lucia.fernandez@ipla.csic.es (L.F.); dianagufer@ipla.csic.es (D.G.); bmf1@ipla.csic.es (B.M.); anarguez@ipla.csic.es (A.R.)

² Nanovex Biotechnologies S.L., Parque Tecnológico de Asturias, CEEI, 33428 Llanera, Spain; pando@nanovexbiotech.com

* Correspondence: pgarcia@ipla.csic.es; Tel.: +34-985-89-34-20

Received: 28 August 2018; Accepted: 11 September 2018; Published: 13 September 2018



Abstract: The antimicrobial properties of bacteriophages make them suitable food biopreservatives. However, such applications require the development of strategies that ensure stability of the phage particles during food processing. In this study, we assess the protective effect of encapsulation of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage phiIPLA-RODI in three kinds of nanovesicles (niosomes, liposomes, and transfersomes). All these systems allowed the successful encapsulation of phage phiIPLA-RODI with an efficiency ranged between 62% and 98%, regardless of the concentration of components (like phospholipids and surfactants) used for vesicle formation. Only niosomes containing 30 mg/mL of surfactants exhibited a slightly lower percentage of encapsulation. Regarding particle size distribution, the values determined for niosomes, liposomes, and transfersomes were $0.82 \pm 0.09 \mu\text{m}$, $1.66 \pm 0.21 \mu\text{m}$, and $0.55 \pm 0.06 \mu\text{m}$, respectively. Importantly, bacteriophage infectivity was maintained during storage for 6 months at 4 °C for all three types of nanovesicles, with the exception of liposomes containing a low concentration of components. In addition, we observed that niosomes partially protected the phage particles from low pH. Thus, while free phiIPLA-RODI was not detectable after 60 min of incubation at pH 4.5, titer of phage encapsulated in niosomes decreased only 2 log units. Overall, our results show that encapsulation represents an appropriate procedure to improve stability and, consequently, antimicrobial efficacy of phages for application in the food processing industry.

Keywords: bacteriophages; encapsulation; niosomes; transfersomes; liposomes; *Staphylococcus aureus*

1. Introduction

Bacteriophages, viruses that infect and kill bacteria, are ubiquitous in the environment. Indeed, they are considered to be the most abundant organisms in the biosphere, playing an important role in biogeochemical cycles and in the development of microbial communities [1]. Over the last few years, there has been a notable interest in exploiting the antimicrobial properties of phages for the control of bacterial pathogens (phage therapy), as a strategy to curtail the relentless increase in antibiotic-resistant bacteria [2–4]. Moreover, phages are harmless to humans, animals, and plants, making them a safe alternative to conventional antimicrobials [5].

Another potential application of bacteriophages is as biocontrol agents along the food chain [6]. The main advantages of bacteriophages in a food context are related to their specificity and safety, and several studies have already confirmed their effectiveness. For example, bacteriophages infecting the most important foodborne pathogens have been successfully used to reduce the microbial load

in livestock, thereby decreasing the risk of transmission of zoonotic bacteria. Also, phages can be directly applied to foods as preservatives to prevent the development of undesirable bacteria [7–9]. Additionally, bacterial viruses have been proposed as promising disinfectants to reduce the risk of food contamination caused by biofilms in food processing industries [10]. Nonetheless, widespread use of bacteriophages in agriculture, farming or food industrial settings will not be possible until they receive full approval by the regulatory authorities. In that sense, it is worth mentioning the recent approval of several phage-based products by the U. S. Food and Drug Administration to be used as food preservatives. Thus, two companies, Intralytix, Inc. (<http://www.intralytix.com>) and Microeos (<http://www.micreos.com>) currently market an array of phage-based products against some of the most important foodborne pathogenic bacteria. Some examples include *Listeria monocytogenes* (ListShield™ and PhageGuard Listex), *E. coli* O157:H7 (EcoShield™), *Shigella* (ShigaShield™) and *Salmonella* (SalmoFresh™ and PhageGuard S).

Depending on the specific use, phages can be delivered by oral administration to animals or by direct spraying on food or industrial surfaces [7,11,12]. In many cases, bacteriophages will encounter harsh physicochemical conditions following the application of phage-based products. For instance, the presence of bile salts and low pH in the gastrointestinal tract of farm animals or the UV light and low pH on the surface of some fruits may lead to inactivation of the viral particles. This would unavoidably result in a loss of infectivity against their target bacterium and, ultimately, failure of the disinfection procedure.

A feasible possibility to overcome this problem is the encapsulation of phages to protect them from environmental challenges so that they can reach their target microbes. (Micro- or nano-) encapsulation is a technology that allows packaging solid, liquid, or gaseous materials in miniature capsules or vesicles that can release their contents at controlled rates, sometimes triggered by specific environmental cues (pH, temperature, etc.) [13]. Indeed, this technique is often used in the food industry for the delivery of bioactive compounds or probiotics [14]. Thus, nanoencapsulation of different compounds like vitamins, minerals, and proteins confers several advantages since the molecules inside the nanovesicles are protected from hazardous environmental conditions and display increased stability as well as greater intestinal and epidermal absorption [15–18]. Indeed, there are several examples in literature where microencapsulation increased the stability of probiotic bacteria in dairy products [19], or the viability of these bacteria during their passage through the gastrointestinal tract [20,21]. Similarly, nanoencapsulation of an antimicrobial peptide (nisin) or lysozyme allowed overcoming stability issues and prevented their interaction with food components when used as additives for dairy products to control the growth of pathogenic bacteria [22,23]. Thus far, there are some studies regarding the encapsulation of bacteriophages in emulsions as well as in micro and nanovesicles prepared using different techniques based on chemical (polymerization) or physical (drying or extrusion) processes. However, there is only limited information about the encapsulation of bacteriophages in liposomes and none concerning the use of other types of nanovesicles (reviewed by [24,25]).

Staphylococcus aureus is an important pathogenic bacterium responsible for serious infections and food-borne diseases in humans [26,27]. The European Food Safety Authority (EFSA) reported a total of 434 food-borne outbreaks caused by staphylococcal toxins in 2015 [28]; meanwhile, 360 outbreak-associated illnesses and 27 hospitalizations were caused by *S. aureus* toxins in the US in 2016 [29]. Furthermore, the increase in methicillin-resistant (MRSA) and vancomycin-resistant strains (VRSA) has fostered research on the development of new weapons to fight against this pathogen [30]. Among these weapons, bacteriophages and phage-derived proteins are an interesting alternative to treat *S. aureus* infections [31,32] and prevent food contamination [33,34].

Our previous work had already demonstrated the ability of bacteriophages to reduce *S. aureus* contamination in dairy products including milk, curd, and cheese [35–37]. Moreover, there is evidence that they can also be used as a helper when combined with hydrostatic high pressure (HHP) to improve the safety of dairy products [38]. More recently, we have isolated and characterized the

polyvalent *Myoviridae* phage phiIPLA-RODI, which is able to infect a broad range of staphylococcal species including *S. aureus* strains from food industry origin [39]. Its high infectivity against both planktonic cultures and biofilms makes it a good candidate for the biocontrol of *S. aureus* in food-related settings. However, the poor stability of phiIPLA-RODI under certain environmental conditions, might compromise its use during processing of fermented products.

The aim of this study was to evaluate the stability of phage phiIPLA-RODI under different encapsulation conditions compatible with the delivery of phage to foods. We also assessed the viability of the encapsulated phage during storage as well as its resistance under extreme conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains

S. aureus IPLA1 was used as the host strain of phage phiIPLA-RODI [39]. Isolated colonies of this strain were obtained by streaking out a frozen stock onto Baird–Parker (BP) agar plates. Subsequent bacterial cultures were routinely grown in tryptic soy broth (TSB; Scharlau, Barcelona, Spain) with shaking or on plates containing TSB supplemented with 2% (*w/v*) bacteriological agar (TSA). The growth temperature for all experiments was 37 °C.

2.2. Phage Propagation and Enumeration

Bacteriophage phiIPLA-RODI was routinely propagated as previously described [39]. Briefly, early exponential cultures of *S. aureus* IPLA1 ($OD_{600} = 0.1$) were infected with the phage at a multiplicity of infection (MOI) of 1. The infected cultures were then incubated for 3 h at 37 °C with vigorous shaking. Phage lysates were obtained by centrifugation of these cultures and subsequent filtration (0.45 µm cellulose acetate Sartolab® RF Vacuum Filters). Afterwards, the phage lysate was partially purified by adding NaCl (0.5 M, final concentration) and PEG 8000 (10%, final concentration). These samples were incubated at 4 °C for 24 h, and then centrifuged at 10,000 rpm at 4 °C for 30 min. The pellet containing the phage particles was suspended in SM buffer (20 mM Tris HCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM Ca(NO₃)₂ and 0.1 M NaCl, pH 7.5).

Phage titer was calculated by the double-layer plaque assay. Briefly, 0.1 mL from a 1:10 dilution of a *S. aureus* IPLA1 stationary culture (10^8 CFU/mL) were mixed with several dilutions of individual phage suspensions in 3 mL of molten TSB supplemented with 0.7% agar and the mixture was poured onto TSA plates and incubated at 37 °C for 18 h. The phage titer was expressed as PFU/mL. All assays were performed using biological triplicates and values were presented as the mean ± standard deviation.

2.3. Encapsulation Processes

Liposomes are bilayer vesicles prepared with phospholipids and containing cholesterol as a stabilizing agent. Their size ranges depending on the type of vesicles formed are the following: multilamellar vesicles (size > 200 nm), large unilamellar vesicles (100–400 nm), small unilamellar vesicles (<100 nm).

Niosomes and transfersomes are similar to liposomes in terms of structure and physical properties. They can be unilamellar or multilamellar vesicles prepared by adding surfactants and other amphiphilic molecules, alternative to phospholipids, such as non-ionic surfactants [40].

Liposomes and niosomes were prepared using Pronanosome Lipo-NTM and Pronanosome Nio-NTM (Nanovex Biotechnologies, Llanera, Spain), respectively. Briefly, different amounts of Pronanosomes were employed to reach different final concentrations (30, 50 and 70 mg/mL). The products were hydrated with a solution of 0.05 M HEPES buffer pH 7.5 (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) and then the bacteriophage suspension (3.2×10^8 PFU/mL) was added at a final concentration of 4% (1.3×10^7 PFU/mL). Then, the samples were mixed in two steps: a first step of manual shaking for 3 min followed by a homogenization step using a homogenizer (Heidolph, Schwabach, Germany) at different speeds and times (Table 1).

Table 1. Composition, characteristics (homogenization and duration, size, zeta potential) and viability (measured as log reduction in phage titer after treatment comparing with the initial titer) of vesicles containing phage phiPLA-RODI.

Vesicles	Composition		Homogenization (rpm)/Duration (min)	Z-Average (μm)	ζ -Potential (mV)	Viability Loss (Log Units)
	Components	Concentration *				
Niosome	Pronanosome Nio-N™	30 mg/mL,	8000/5	0.83 ± 0.11	−34.3 ± 1.0	0.5 ± 0.1
		50 mg/mL, or		0.85 ± 0.12	−33.4 ± 0.2	1.0 ± 0.2
		70 mg/mL		0.80 ± 0.07	−35.6 ± 1.3	1.1 ± 0.2
Liposome	Pronanosome Lipo-N™	30 mg/mL,	5000/5	1.51 ± 0.17	−14.1 ± 1.0	1.3 ± 0.1
		50 mg/mL, or		1.60 ± 0.17	−14.1 ± 0.5	1.2 ± 0.2
		70 mg/mL		1.89 ± 0.03	−13.5 ± 0.1	1.2 ± 0.2
Transfersome	Phospholipon 90G and Span 60 (1:1)	30 mg/mL,	8000/5	0.51 ± 0.07	−30.3 ± 1.2	1.4 ± 0.3
		50 mg/mL, or		0.55 ± 0.03	−30.8 ± 2.0	1.2 ± 0.0
		70 mg/mL		0.58 ± 0.06	−28.6 ± 0.2	1.3 ± 0.1

Notes: Each value represents the mean ± standard deviation of three samples. * In the case of transfersomes, the concentration refers to the total of the two components.

Transfersomes were prepared by the thin film hydration (TFH) or dry film method [41] with minor modifications. Different amounts (30, 50 and 70 mg/mL) of Phospholipon 90G (P90; Lipoid, Ludwigshafen, Germany) and Span 60 (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) (1:1) were dissolved in chloroform. Chloroform was subsequently removed by incubation at 40 °C, under reduced pressure in a rotary evaporator (Heidolph, Schwabach, Germany) until the formation of a dry film, which was subsequently hydrated by a solution of 0.05 M HEPES buffer pH 7.5. Then, bacteriophages were added at a final concentration of 4% (1.3×10^7 PFU/mL). The nanovesicles were subsequently generated after being submitted to 3 min of manual shaking and homogenized for 5 min at 8000 rpm (Table 1).

2.4. Characterization of Nanovesicles

Mean (Z-Average) particle size in the different nanovesicles (niosomes, liposomes and transfersomes) was determined by using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK), via Dynamic Light Scattering (DSL).

The ζ -potential is strongly linked to vesicle stability, with high absolute values of ζ -potential indicating electrostatic repulsion between vesicles. To determine the ζ -potential the M3-PALS (Phase Analysis Light Scattering) technique was used [15]. Three independent samples were taken from each formulation at room temperature and values were expressed as mean ± standard deviation.

2.5. Viability and Encapsulation Efficiency

The number of bacteriophages that did not survive the formulation process for niosomes, liposomes or transfersomes, was expressed as log reduction in viability:

$$\text{Viability} = \log_{10} \left(\frac{\text{Total phage titer after treatment} \left(\frac{\text{PFU}}{\text{mL}} \right)}{\text{Initial titer} \left(\frac{\text{PFU}}{\text{mL}} \right)} \right) \quad (1)$$

Phage viability after the formation of niosomes, liposomes and transfersomes was obtained by determining the total phage titer (encapsulated + non encapsulated). To determine the titer of non-encapsulated phages or free phages (F), aliquots containing 1.5 mL of niosomes, liposomes and transfersomes were centrifuged at 13,200 rpm and 4 °C for 60 min and the supernatant was titrated as described above. To determine the titer of encapsulated phages, the pellet containing the nanovesicles was washed twice with PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 and 2 mM KH_2PO_4 ; pH 7.4) following supernatant removal, and centrifuged again under the same conditions. Again, the supernatant was removed and the pellet was kept for further processing. Then, pellets were treated with 30 μL of chloroform and vortexed for 5 s to disrupt the vesicles. Finally, SM buffer was added up to a final volume of 1.5 mL. This mixture was centrifuged for 15 min at 10,000 rpm

and 4 °C. Serial dilutions of the supernatant were then plated by using the double layer technique for phage titration.

The efficiency of encapsulation (EE) was calculated as the percentage of phages encapsulated inside nanovesicles compared to the total phage titer:

$$EE = \left(\frac{\text{Encapsulated phage (E) (PFU/mL)}}{\text{Total phage (PFU/mL)}} \right) \times 100 \quad (2)$$

where, total phage = encapsulated phage (E) + non encapsulated or free phage (F).

2.6. Stability of Encapsulated Phages During Storage

The stability of phages entrapped into nanovesicles (niosomes, liposomes, and transfersomes) was determined by storage of samples at 4 °C for 6 months. Every two months the viability of free and encapsulated phages was determined. A phiIPLA-RODI suspension (1.49×10^8 PFU/mL) in SM was used as control. Three independent samples were taken from each formulation and from the control phage suspension. The titer was presented as the mean of these values \pm standard deviation.

2.7. Stability of Encapsulated Phages Under Extreme Conditions

The stability of phages encapsulated in niosomes, liposomes, and transfersomes at a pH of 4.5 was determined by preparing a 1:2 dilution of the nanovesicles in Britton–Robinson pH universal buffer (40 mM H₃PO₄, 40 mM CH₃COOH, 40 mM H₃BO₃, adjusted to pH 4.5) and then incubating the samples at room temperature for 60 min. Similarly, nanovesicles were incubated in the following conditions: (1) dilution (1/10) in NaCl 4.5 M for 60 min at room temperature, and (2) at 60 °C for 90 min. For control purposes, a phage suspension in SM buffer was subjected to the same treatments. After treatment, samples were centrifuged and the supernatant was titrated to determine the number of non-encapsulated phages. Viability of encapsulated phages was quantified after disruption of the nanovesicles as indicated above. The initial titer of samples before treatment was taken as a control. All assays were performed by triplicate.

2.8. Statistical Analysis

Statistical analyses for encapsulation efficiency and phage stability were performed using the statistical package IBM SPSS Statistics for Windows Version 23 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). The differences in data related to phage encapsulation efficiency and its stability were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA). The Student–Newman–Keuls (SNK) test was used for comparison of means of the stability of phiIPLA-RODI in the different nanovesicles at a level of significance $p < 0.05$. Three biological replicates were used in all the assays.

3. Results

3.1. Bacteriophage phiIPLA-RODI Can Be Successfully Entrapped in Different Nanovesicles

With the aim of seeking an optimal formulation for the application of phage phiIPLA-RODI, we examined the efficacy of different encapsulation techniques. In a first step, we determined the stability of the phage during different encapsulation processes and assessed the properties of the resulting nanovesicles. To do that, a phage suspension (3.2×10^8 PFU/mL) was encapsulated into niosomes, liposomes, and transfersomes. Then, the size of the prepared vesicles was measured using Dynamic Light Scattering. The nanovesicles formed had an average size in the range of 0.5 μ m to 2 μ m (0.82 ± 0.09 μ m for niosomes, 1.66 ± 0.21 μ m for liposomes and 0.55 ± 0.06 μ m for transfersomes). Also, the net charge of the nanovesicles surface was estimated by determination of the ζ -potential, with liposomes showing the lowest absolute values (Table 1). Additionally, the viability of phages after the encapsulation process was determined. The results obtained in phage titration assays indicated that phiIPLA-RODI phage particles could withstand all the encapsulation methods tested, as all

nanovesicles contained infective phages. However, the titer of phages released after the disruption of nanovesicles was variable, with a reduction ranging from 0.5 to 1.4 log units compared to the initial phage titer (Table 1).

3.2. The Efficiency of phiIPLA-RODI Encapsulation Is Not Greatly Influenced by Component Concentration

Once established that phage phiIPLA-RODI could be successfully encapsulated in nanovesicles, we examined whether differences in the composition of the vesicles may affect the encapsulation efficiency. In order to do that, the three types of nanovesicles (niosomes, liposomes and transfersomes) were prepared by using different concentrations (30, 50 and 70 mg/mL) of their respective components. The results of this experiment indicated that the percentage of encapsulation was largely independent of the concentration of components or the nanovesicle type ($p > 0.05$) (Table 2). The only exception to this was that, for niosomes, the highest encapsulation efficiencies (99% and 94%) were obtained by using 30 and 50 mg/mL of Pronanosome Nio-N™, while only a 62% was observed when niosomes were made with 70 mg/mL. Although not statistically significant, it is worth noting that liposomes formed using 70 mg/mL of Pronanosome Lipo-N™ and transfersomes containing 30 mg/mL of components (Phospholipon 90G and Span 60) showed variable results between different replicates (Table 2). This suggests that encapsulation of phiIPLA-RODI using those concentrations would not consistently result in high encapsulation efficiencies.

Table 2. Encapsulation efficiency for bacteriophage phiIPLA-RODI in niosomes, liposomes and transfersomes prepared using different concentrations of components.

Concentration of Components (mg/mL)	Encapsulation Efficiency (% PFU/mL)		
	Niosomes	Liposomes	Transfersomes
30	99.8.0 ± 0.03	98.6 ± 0.47	76.9 ± 21.49
50	94.5 ± 3.29	95.2 ± 4.30	95.6 ± 4.96
70	62.3 ± 14.35 ^{*,#}	85.5 ± 9.04	96.6 ± 2.89

Notes: Each value represents the mean ± standard deviation of three samples. The asterisk (*) indicates a significantly different efficiency of encapsulation as a function of the concentration and the pound (#) as a function of the type of nanovesicle ($p < 0.05$; ANOVA).

3.3. Stability of Encapsulated Phage Particles during Storage at Low Temperature

One of the main challenges associated to the development of phage-based products is to ensure their stability under storage conditions. With this in mind, we assessed whether encapsulated and non-encapsulated phiIPLA-RODI particles remained viable during storage at 4 °C throughout a 6-month period. As a control, we tested the stability of a phage suspension in SM buffer (1.49×10^8 PFU/mL).

A high stability was observed for phages encapsulated in all three types of nanovesicles regardless of the nature and concentration of their components, with decreases in phage titer below 2 log units (Figure 1). The only exception was observed for phages encapsulated in liposomes formed with 30 mg/mL of Pronanosome Lipo-N™. In this case, there was a 3-log reduction in encapsulated phage titer after four months, and a similar decrease in non-encapsulated phage titer after only two months. In general, the stability of free phages was lower than that of encapsulated phages in all the formulations tested. Indeed, in the case of transfersomes, the differences in phage titer after six months between the encapsulated and non-encapsulated fractions ranged between 2 and 4 log units depending on the component concentration (Figure 1). In contrast, the differences observed for niosomes and liposomes were always below 1 log unit (Figure 1). Surprisingly, the titer of control phage suspension was reduced only by 1 log unit ($7.14 \pm 0.25 \log_{10}$ PFU/mL) after 6 months of storage, which means that, only for phages inside niosomes (50 and 70 mg/mL) and liposomes (50 mg/mL), the stability of phage was improved ($p < 0.05$).

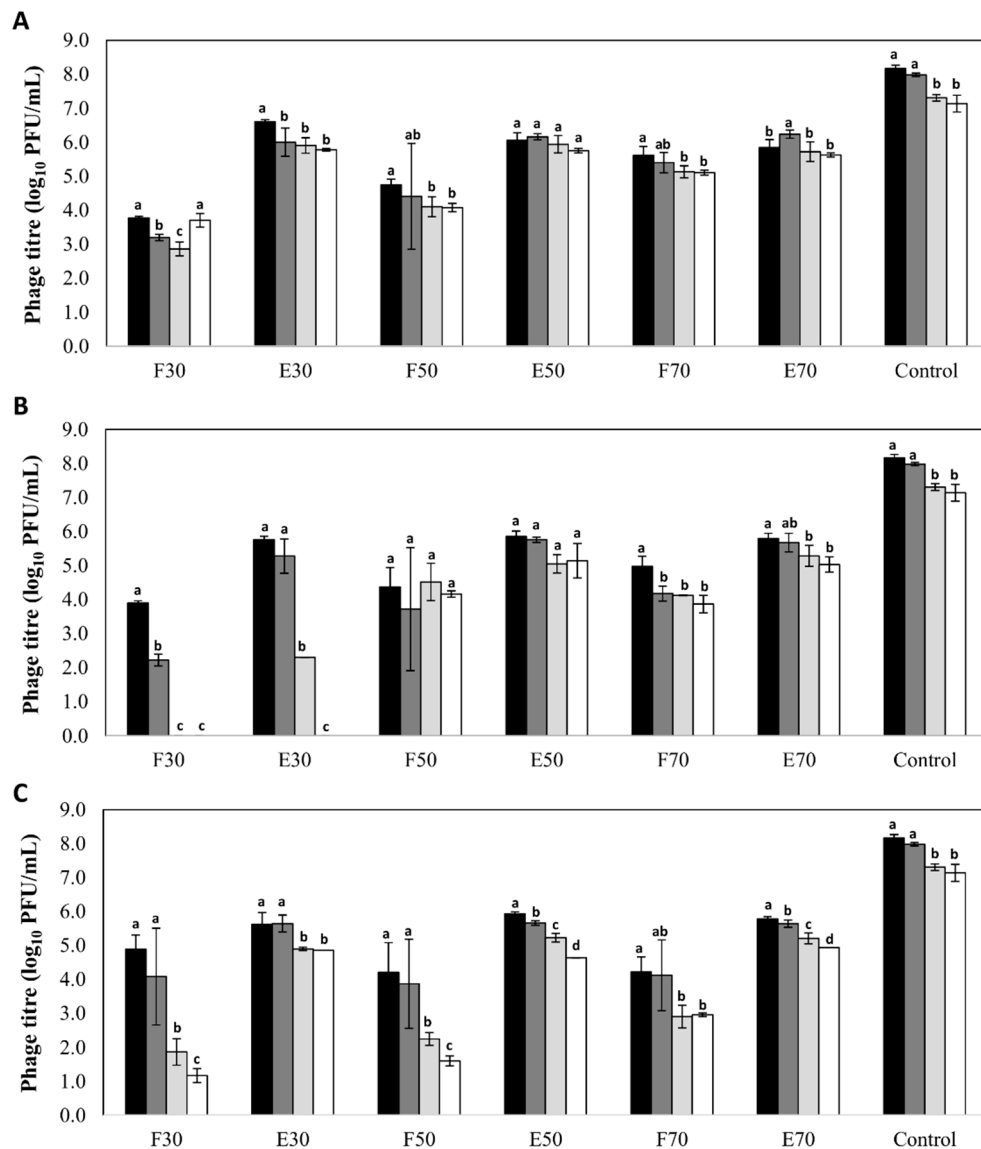


Figure 1. Stability (\log_{10} PFU/mL) of bacteriophage phiIPLA-RODI encapsulated in different types of nanovesicles and in SM buffer (control), after storage at 4 °C: (A) niosomes, (B) liposomes and (C) transfersomes. Phage titer was determined after encapsulation (black bars) and also after storage for 2 months (dark grey bars), 4 months (light grey bars) and 6 months (white bars). (F): non encapsulated or free phage; (E): encapsulated phage. Numbers (30, 50 or 70) indicates the concentration of components expressed in mg/mL. Bars represent mean \pm standard deviation of three biological replicates. Different letters indicate differences in stability ($p < 0.05$; ANOVA and SNK post-hoc comparison).

3.4. Niosomes Protect Phages from Low pH and High Temperature

A major advantage of nanovesicles for the application of bacteriophages in the food industry would be the protection of the viral particles from adverse physicochemical conditions commonly found in food-processing settings. Here, we examined if encapsulation of the phiIPLA-RODI in niosomes, liposomes or transfersomes had a protective effect against low pH. The results obtained indicated that niosomes effectively protect phages at a pH of 4.5. Thus, while non-encapsulated phages and control phage suspension were completely inactivated under these conditions, phages entrapped inside niosomes retained part of their infectivity, exhibiting only a reduction of ~ 2 log units (Table 3).

Table 3. Stability (\log_{10} PFU/mL) of bacteriophage phiIPLA-RODI to different treatments.

Nanovesicles	Component (mg/mL)	Phage phiIPLA-RODI	Initial Titer \log_{10} (PFU/mL)	pH 4.5 60 min	T° 60 °C 90 min	NaCl 4.5 M 60 min
Niosomes	30	F	3.73 ± 0.20	–	–	4.74 ± 0.08 *
		E	5.78 ± 0.03	3.78 ± 0.1 *	3.54 ± 0.50 *	4.52 ± 0.13 *
		T	5.78 ± 0.03	3.78 ± 0.1 *	3.54 ± 0.50 *	4.95 ± 0.02 *
	50	F	4.09 ± 0.12	–	N/A	5.32 ± 0.18 *
		E	5.76 ± 0.07	4.00 ± 0.19 *	N/A	4.50 ± 0.10 *
		T	5.77 ± 0.06	4.00 ± 0.19 *	N/A	5.38 ± 0.15 *
	70	F	5.11 ± 0.07	–	N/A	5.79 ± 0.17 *
		E	5.63 ± 0.06	3.85 ± 0.16 *	N/A	4.44 ± 0.11 *
		T	5.74 ± 0.04	3.85 ± 0.16 *	N/A	5.81 ± 0.16
Liposomes	30	F	3.53 ± 0.15	–	–	5.03 ± 0.32 *
		E	5.80 ± 0.85	–	–	4.85 ± 0.22
		T	5.80 ± 0.84	–	–	5.25 ± 0.25
	50	F	4.16 ± 0.09	–	N/A	5.05 ± 0.12 *
		E	5.14 ± 0.51	3.46 ± 0.28 *	–	4.03 ± 0.37 *
		T	5.18 ± 0.22	3.46 ± 0.28 *	N/A	5.19 ± 0.14
	70	F	3.87 ± 0.26	–	N/A	4.71 ± 0.68
		E	5.03 ± 0.22	2.30 ± 0.24 *	N/A	4.48 ± 0.54
		T	5.06 ± 0.18	2.30 ± 0.24 *	N/A	4.91 ± 0.62
Transfersomes	30	F	–	–	–	4.93 ± 0.53 *
		E	4.88 ± 0.21	–	–	4.43 ± 0.34
		T	4.88 ± 0.21	–	–	5.01 ± 0.48
	50	F	–	–	N/A	5.01 ± 0.43 *
		E	4.63 ± 0.15	–	N/A	4.18 ± 0.22 *
		T	4.63 ± 0.15	–	N/A	4.75 ± 0.52
	70	F	2.95 ± 0.02	–	N/A	5.05 ± 0.19 *
		E	4.93 ± 0.05	–	N/A	4.60 ± 0.05 *
		T	4.94 ± 0.10	–	N/A	5.18 ± 0.17
Control phage in SM buffer	N/A	N/A	8.52 ± 0.10	–	4.75 ± 0.22 *	8.08 ± 0.48

Note: Each value represents the mean ± standard deviation of three samples. (F): free or non-encapsulated phage; (E): encapsulated phage; (T): Total phage = F + E. Initial titer: titer of phage before treatment process. (–) Below bacteriophage threshold (10^2 PFU/mL). The asterisk (*) indicates a statistically significant difference with respect to the initial titer. N/A: not applicable.

Overall, liposomes turned out to be less stable at low pH values, as only those vesicles containing 50 and 70 mg/mL of Pronanosome Lipo-N™ were able to protect the encapsulated phages, showing a reduction of nearly 2–3 log units with respect to the initial phage titer. No protective effect from low pH was achieved in the case of transfersomes, as no active phage particles could be detected after the treatment (Table 3).

Regarding temperature stability, phage encapsulation in liposomes and transfersomes did not offer protection in treatments at 60 °C for 90 min. Indeed, a total loss of viability was observed for both encapsulated and non-encapsulated phages. Similarly, an equivalent reduction in phage titer (about 4 log units) was recorded for the control phage suspension. In contrast, niosomes exerted better protection of the encapsulated phages since lower reduction in phage titer (2–3 log units) was detected (Table 3).

Although high NaCl concentrations had not any appreciable effect on phage stability, we tested the impact on nanovesicles of 4.5 M NaCl for 60 min, since this salt concentration could cause vesicles destabilization. Indeed, we observed a slight reduction (~1 log unit) in encapsulated phage titer and an increase in non-encapsulated phages, regardless of the type of nanovesicle and the surfactant concentration used (Table 3). These results suggest a slight destabilization of the nanovesicles in the presence of a high salt concentration that results in the partial release of encapsulated phages.

4. Discussion

The increasing number of studies confirming the success of phages as antimicrobials along with the current trend in the consumption of healthy, chemical-free foods has boosted the interest in bacteriophages as natural biopreservatives [42] and disinfectants [10]. However, for phage-based products to be successful, it is necessary to design proper formulations that meet certain stability requirements that standard phage suspensions do not currently have. Microencapsulation techniques including emulsification, extrusion, spray-drying, electrospun nanofibers and whey protein films have been proposed as feasible alternatives to solve this problem [24]. In addition, the use of food-compatible nanomaterials together with an approved preparation procedure, including food-grade solvents and detergents, is also an essential requirement [14]. In the present study, we attempted to find the most effective techniques for the encapsulation of phage particles to be used in food industry applications.

In a first step, we confirmed that phage phiIPLA-RODI remained stable after different encapsulation processes including niosomes, liposomes and transfersomes.

Phages encapsulated into niosomes (50 and 70 mg/mL of Pronanosome Nio-N™) and liposomes (50 mg/mL of Pronanosome Lipo-N™) retained stability for longer periods of time than those kept in SM suspension. All studies published so far report the use of liposomes as vehicles to encapsulate phages [8,43], but there are no reports about the use of niosomes and transfersomes. To determine the optimal conditions that result in the highest encapsulation efficiency for phage phiIPLA-RODI, we prepared nanovesicles using different concentrations of surfactants and phospholipids. A previous study reported that total lipid concentration was an important factor for the loading efficiency of liposomes [44]. However, we did not usually observe this trend when encapsulating phiIPLA-RODI in different types of nanovesicles. Indeed, a reduction in component concentration only improved encapsulation of phiIPLA-RODI into niosomes, but did not significantly modify the encapsulation efficiency in liposomes or transfersomes. Additionally, we could not establish any correlation between encapsulation efficiency and the average particle size associated to each vesicle type. For instance, the average size of transfersomes (~0.5 µm) was three times smaller than that of liposomes (~1.6 µm), but similar phage encapsulation efficiencies were obtained with both types of nanovesicles. In contrast, Leung et al. [45], found that encapsulation efficiency increased with vesicle size in liposomes obtained by using microfluidics, although this trend was only observed for small vesicles (up to 0.5 µm).

The use of encapsulated phages for therapeutic [25] or food applications [46] requires optimization of the formulation process. For example, it is paramount to control the release of phages from nanovesicles and maximize the stability of the encapsulated phage particles. Release of phages can be controlled by external parameters such as temperature or pH, provided they do not negatively affect the phage, or by spontaneous rupture in contact with components of food matrix [25]. Overall, we found that the stability during storage of the encapsulated phages was always higher than that of free or non-encapsulated phages in the same suspension, but the stability was only higher than that of the control phage suspension in SM buffer in some cases. A high stability of encapsulated phages is in accordance (consonance) with previous findings where nanoencapsulation in liposomes increased phage stability during storage conditions as well as during their delivery to animals [8,43]. Moreover, the use of phages inside liposomes facilitates their entry into macrophages and also protects phages from neutralizing antibodies [47]. More specifically, we found that encapsulation of phage phiIPLA-RODI into niosomes and liposomes led to a slightly higher stability during storage at 4 °C than encapsulation into transfersomes. Thus, viability of phages encapsulated in transfersomes (70 mg/mL of Phospholipon 90G and Span 60) after six months of storage was lower than that obtained for niosomes. It does not appear that the low stability of phages in transfersomes is related with the ζ-potential of these nanovesicles, as it was quite similar to that of niosomes. It is also worth noting the deleterious effect for phage phiIPLA-RODI of storage in liposomes containing 30 mg/mL of Pronanosome Lipo-N™. In fact, even non-encapsulated phages were inactivated in these suspensions. It does not seem, however, that this result is due to a low stability of phiIPLA-RODI at low temperatures since this phage is highly stable under refrigeration conditions. We can speculate that components

from liposomes might bind to the phage proteins necessary for the recognition of and/or binding to the cell receptor, thereby inhibiting their interaction with host bacteria. An increase in the concentration of components might help to stabilize liposomes, as can be deduced from the higher protection of phages by liposomes containing 50 and 70 mg/mL of Pronanosome Lipo-N™. Therefore, the low stability of liposomes containing 30 mg/mL would result in the release of these components to the suspension. These components may interact with phage proteins and potentially inactivate the phage particles.

Despite the well-established antimicrobial activity of bacteriophages in some food applications, their use might be limited under certain processing conditions that inactivate the phage particles. For instance, the fermentation of milk by lactic acid bacteria results in a $\text{pH} \leq 4.5$, which leads to the inactivation of many bacteriophages including phiIPLA-RODI [39]. For this reason, we investigated here if encapsulation was an effective method for the protection of phage phiIPLA-RODI from low pH values. Our results confirmed the protective effect of niosomes under acidic conditions. However, we observed that liposomes only offered partial protection to the phage particles, with a decrease in phage viability of up to 3 log units. Regarding transfersomes, our results indicated that they had a negligible contribution to phage stability maintenance. Moreover, our results show that transfersomes themselves were not stable at low pH values, which may be related to their specific content in Phospholipon 90G and Span 60. In fact, it is a common practice to modulate liposome stability at different pH values by changing their composition as a means to control the release of the vesicle content [48]. This has great relevance for the delivery of drugs, enzymes, and other therapeutics into vesicles that will only release their content at the pH of the target organ [48]. In an agro-food context, protection of phages against extremely acidic conditions was an approach used by Colom [8] to deliver *Salmonella* phages to the chicken stomach and to increase their residence time in the intestinal tract. These authors found that phages encapsulated into liposomes were stable after exposure to a pH of 2.8 and, although the phage titer was reduced by 3–5 log units, protection against *Salmonella* by the encapsulated phages persisted for at least 1 week.

In relation to the higher stability to temperature of niosomes, their composition with non-ionic surfactants might explain this result because they are more stable than phospholipids [49]. Indeed, phage phiIPLA-RODI inside niosomes turned out to be less sensitive to temperature than in a SM buffer suspension, as a reduction of 2–3 log-units was observed compared to 4 log units reduction in the control suspension.

Furthermore, we explore the stability of nanovesicles under external conditions that, without having an effect on phage viability, might destabilize their structure and, therefore, expose phages to further undesirable conditions. For example, high salt concentrations are frequently used in the processing of some foods such as cheese, but do not seem to affect the viability of phiIPLA-RODI. Indeed, all nanovesicles turned out to be quite stable in the presence of NaCl. However, in some cases, we observed a slight increase in non-encapsulated phages and a reduction in encapsulated phages, which suggests that some nanovesicles opened spontaneously, releasing the encapsulated phage particles. The spontaneous release of compounds when nanovesicles are applied to food might be a feasible approach for phage delivery. It has been previously used to incorporate cheese-ripening enzymes to milk in order to accelerate cheese proteolysis [50,51]. The rate of release could be affected by some factors such as cheese fat content, being stimulated by increasing the fat content (0% to 20%) [52].

It is worth noting that nanovesicles are considered to have a promising future in the food industry. Indeed, several commercialized liposome products have already been approved for different applications including food supplements and food preservatives as well as products for pathogen and pesticide detection [53].

Overall, our results show that nanovesicles are also suitable candidates for the production of phiIPLA-RODI-based formulations that will help to maintain phage stability during food processing conditions or in the gastrointestinal tract. More specifically, our results thus far seem to indicate that niosomes are the most interesting nanovesicles for the encapsulation of phiIPLA-RODI. Indeed,

in addition to offering the greatest protection to the phage particles, they are also less costly than liposomes [40]. Future work will validate the effectiveness of encapsulated phages in a food matrix as long as the niosomes synthesis procedures are ready for scaling up, in order to make these formulations a real alternative to the food industry.

Author Contributions: E.G.-M., L.F., D.G., D.P., B.M., A.R. and P.G. conceived and designed the experiments; and E.G.-M. performed the experiments; E.G.-M. and P.G. analyzed the data; E.G.-M., L.F., D.G., D.P., B.M., A.R. and P.G. wrote the paper.

Funding: This research study was funded by grant AGL2015-65673-R (MINEICO, Program of Science, Technology and Innovation 2013–2017, Spain, EU ANIWHIA ERA-NET (BLAAT ID: 67)-PCIN-2017-001 (MINEICO, State Program of Research, Development and Innovation focused to Societal Challenges 2013–2017, Spain). Proyecto Intramural CSIC 201770E016, and GRUPIN14-139 (FEDER EU funds, Principado de Asturias, Spain).

Acknowledgments: PG, BM, and AR are members of the FWO Vlaanderen funded “Phagebiotics” research community (WO.016.14) and the bacteriophage network FAGOMA. We thank R. Calvo for technical assistance.

Conflicts of Interest: D.P. is employee of Nanovex Biotechnologies S.L. The rest of authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Clokie, M.R.; Millard, A.D.; Letarov, A.V.; Heaphy, S. Phages in nature. *Bacteriophage* **2011**, *1*, 31–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wright, A.; Hawkins, C.H.; Anggård, E.E.; Harper, D.R. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin. Otolaryngol.* **2009**, *34*, 349–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Saez, A.C.; Zhang, J.; Rostagno, M.H.; Ebner, P.D. Direct feeding of microencapsulated bacteriophages to reduce *Salmonella* colonization in pigs. *Foodborne Pathog. Dis.* **2011**, *8*, 1269–1274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Borie, C.; Albala, I.; Sánchez, P.; Sánchez, M.L.; Ramírez, S.; Navarro, C.; Morales, M.A.; Retamales, A.J.; Robeson, J. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. *Avian Dis.* **2008**, *52*, 64–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kutter, E.; de Vos, D.; Gvasalia, G.; Alavidze, Z.; Gogokhia, L.; Kuhl, S.; Abedon, S.T. Phage therapy in clinical practice: Treatment of human infections. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2010**, *11*, 69–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. García, P.; Martínez, B.; Obeso, J.M.; Rodríguez, A. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett. Appl. Microbiol.* **2008**, *47*, 479–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bueno, E.; García, P.; Martínez, B.; Rodríguez, A. Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *158*, 23–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Colom, J.; Cano-Sarabia, M.; Otero, J.; Cortés, P.; MasPOCH, D.; Llagostera, M. Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 4841–4849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Sheng, H.; Knecht, H.J.; Kudva, I.T.; Hovde, C.J. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 5359–5366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Gutiérrez, D.; Rodríguez-Rubio, L.; Martínez, B.; Rodríguez, A.; García, P. Bacteriophages as Weapons against Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hammerl, J.A.; Jäckel, C.; Alter, T.; Janzcyk, P.; Stingl, K.; Knüver, M.T.; Hertwig, S. Reduction of *Campylobacter jejuni* in broiler chicken by successive application of group II and group III phages. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Soni, K.A.; Nannapaneni, R. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. *J. Food Protect.* **2010**, *73*, 1519–31524. [[CrossRef](#)]
13. Anal, A.K.; Singh, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18*, 240–251. [[CrossRef](#)]
14. Dias, M.I.; Ferreira, I.C.; Barreiro, M.F. Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food Funct.* **2015**, *6*, 1035–1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Pando, D.; Beltrán, M.; Gerone, I.; Matos, M.; Pazos, C. Resveratrol entrapped niosomes as yoghurt additive. *Food Chem.* **2015**, *170*, 281–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Davis, J.L.; Paris, H.L.; Beals, J.W.; Binns, S.E.; Giordano, G.R.; Scalzo, R.L.; Bell, C. Liposomal-encapsulated ascorbic acid: Influence on vitamin C bioavailability and capacity to protect against ischemia–reperfusion injury. *Nutr. Metab. Insights* **2016**, *9*, 25–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Gutiérrez, G.; Matos, M.; Barrero, P.; Pando, D.; Iglesias, O.; Pazos, C. Iron-entrapped niosomes and their potential application for yogurt fortification. *LWT Food Sci. Technol.* **2016**, *74*, 550–556. [[CrossRef](#)]
18. Parmentier, J.; Thewes, B.; Gropp, F.; Fricker, G. Oral peptide delivery by tetraether lipid liposomes. *Int. J. Pharm.* **2011**, *415*, 150–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Schoina, V.; Terpou, A.; Angelika-Ioanna, G.; Koutinas, A.; Kanellaki, M.; Bosnea, L. Use of Pistacia terebinthus resin as immobilization support for *Lactobacillus casei* cells and application in selected dairy products. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 5700–5708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. D’Orazio, G.; Di Gennaro, P.; Boccarusso, M.; Presti, I.; Bizzaro, G.; Giardina, S.; Michelotti, A.; Labra, M.; La Ferla, B. Microencapsulation of new probiotic formulations for gastrointestinal delivery: In vitro study to assess viability and biological properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 9779–9789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Rodklongtan, A.; La-Ongkham, O.; Nitisingprasert, S.; Chitprasert, P. Enhancement of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 survival in broiler gastrointestinal tract by microencapsulation with alginate-chitosan semi-interpenetrating polymer networks. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117*, 227–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Malheiros, P.S.; Sant’Anna, V.; Utpott, M.; Brandelli, A. Antilisterial activity and stability of nanovesicle-encapsulated antimicrobial peptide P34 in milk. *Food Control* **2012**, *23*, 42–47. [[CrossRef](#)]
23. Were, L.M.; Bruce, B.; Davidson, P.M.; Weiss, J. Encapsulation of nisin and lysozyme in liposomes enhances efficacy against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 922–927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Choiniska-Pulit, A.; Miłucha, P.; Śliwka, P.; Łaba, W.; Kurzępa-Skaradzińska, A. Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *45*, 212–221. [[CrossRef](#)]
25. Malik, D.J.; Sokolov, I.J.; Vinner, G.K.; Mancuso, F.; Cinquerrui, S.; Vladislavljevic, G.T.; Clokie, M.R.J.; Garton, N.J.; Stapley, A.G.F.; Kirpichnikova, A. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *249*, 100–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lowy, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 520–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Le Loir, Y.; Baron, F.; Gautier, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* **2003**, *2*, 63–76. [[PubMed](#)]
28. European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* **2016**, *14*, 4634. [[CrossRef](#)]
29. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *National Outbreak Reporting System (NORS)*; Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Atlanta, GA, USA, 2017.
30. Kurosu, M.; Siricilla, S.; Mitachi, K. Advances in MRSA drug discovery: Where are we and where do we need to be? *Expert Opin. Drug Discov.* **2013**, *8*, 1095–1116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Rhoads, D.D.; Wolcott, R.D.; Kuskowski, M.A.; Wolcott, B.M.; Ward, L.S.; Sulakvelidze, A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: Results of a phase I safety trial. *J. Wound Care* **2009**, *18*, 237–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Fischetti, V.A. Using phage lytic enzymes to control pathogenic bacteria. *BMC Oral Health* **2006**, *6*, S16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. El Haddad, L.; Roy, J.P.; Khalil, G.E.; St-Gelais, D.; Champagne, C.P.; Labrie, S.; Moineau, S. Efficacy of two *Staphylococcus aureus* phage cocktails in cheese production. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *217*, 7–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Guo, T.; Xin, Y.; Zhang, C.; Ouyang, X.; Kong, J. The potential of the endolysin Lysdb from *Lactobacillus delbrueckii* phage for combating *Staphylococcus aureus* during cheese manufacture from raw milk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 3545–3554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. García, P.; Madera, C.; Martínez, B.; Rodríguez, A. Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *Int. Dairy J.* **2007**, *17*, 1232–1239. [[CrossRef](#)]

36. Obeso, J.M.; García, P.; Martínez, B.; Arroyo-López, F.N.; Garrido-Fernández, A.; Rodríguez, A. Use of logistic regression for prediction of the fate of *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk in the presence of two lytic phages. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 6038–6046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. García, P.; Madera, C.; Martínez, B.; Rodríguez, A.; Suarez, J.E. Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92*, 3019–3026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Tabla, R.; Martínez, B.; Rebollo, J.E.; Gonzalez, J.; Ramirez, M.R.; Roa, I.; Rodriguez, A.; Garcia, P. Bacteriophage performance against *Staphylococcus aureus* in milk is improved by high hydrostatic pressure treatments. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *156*, 209–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Gutiérrez, D.; Vandenheuvel, D.; Martínez, B.; Rodríguez, A.; Lavigne, R.; García, P. Two Phages, phiPLA-RODI and phiPLA-C1C, lyse mono- and dual-species staphylococcal biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 3336–3348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Marianecchi, C.; Di Marzio, L.; Rinaldi, F.; Celia, C.; Paolino, D.; Alhaique, F.; Esposito, S.; Carafa, M. Niosomes from 80s to present: The state of the art. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *205*, 187–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Watkins, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238–252. [[CrossRef](#)]
42. Coffey, B.; Mills, S.; Coffey, A.; McAuliffe, O.; Ross, R.P. Phage and their lysins as biocontrol agents for food safety applications. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2010**, *1*, 449–468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Singla, S.; Harjai, K.; Raza, K.; Wadhwa, S.; Katare, O.P.; Chhibber, S. Phospholipid vesicles encapsulated bacteriophage: A novel approach to enhance phage biodistribution. *J. Virol. Methods* **2016**, *236*, 68–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Nallamotheu, R.; Wood, G.C.; Kiani, M.F.; Moore, B.M.; Horton, F.P.; Thoma, L.A. A targeted liposome delivery system for combretastatin A4: Formulation optimization through drug loading and in vitro release studies. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **2006**, *60*, 144–155. [[PubMed](#)]
45. Leung, S.S.; Morales, S.; Britton, W.; Kutter, E.; Chan, H.K. Microfluidic-assisted bacteriophage encapsulation into liposomes. *Int. J. Pharm.* **2018**, *545*, 176–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ahmadi, H.; Wang, Q.; Lim, L.T.; Balamurugan, S. Encapsulation of Listeria Phage A511 by Alginate to Improve Its Thermal Stability. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1681*, 89–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Singla, S.; Harjai, K.; Katare, O.P.; Chhibber, S. Encapsulation of bacteriophage in liposome accentuates its entry in to macrophage and shields it from neutralizing antibodies. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Drummond, D.C.; Zignani, M.; Leroux, J.C. Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Prog. Lipid Res.* **2000**, *39*, 409–460. [[CrossRef](#)]
49. Kumar, G.P.; Rajeshwarrao, P. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—An overview. *Acta Pharm. Sin. B* **2001**, *1*, 208–219. [[CrossRef](#)]
50. Picon, A.; Gaya, P.; Medina, M.; Nunez, M. Proteinases encapsulated in stimulated release liposomes for cheese ripening. *Biotechnol. Lett.* **1997**, *19*, 345–348. [[CrossRef](#)]
51. Kheadr, E.E.; Vuilleumard, J.C.; El Deeb, S.A. Accelerated Cheddar cheese ripening with encapsulated proteinases. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2000**, *35*, 483–495. [[CrossRef](#)]
52. Laloy, E.; Vuilleumard, J.C.; Dufour, P.; Simard, R. Release of enzymes from liposomes during cheese ripening. *J. Control. Release* **1998**, *54*, 213–222. [[CrossRef](#)]
53. Shukla, S.; Haldorai, Y.; Hwang, S.K.; Bajpai, V.K.; Huh, Y.S.; Han, Y.K. Current Demands for Food-Approved Liposome Nanoparticles in Food and Safety Sector. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Study of the Interactions Between Bacteriophage phiIPLA-RODI and Four Chemical Disinfectants for the Elimination of *Staphylococcus aureus* Contamination

Seila Agún, Lucía Fernández *, Eva González-Menéndez, Beatriz Martínez , Ana Rodríguez and Pilar García

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain; shei_s@hotmail.com (S.A.); eva.gm@ipla.csic.es (E.G.-M.); bmf1@ipla.csic.es (B.M.); anarguez@ipla.csic.es (A.R.); pgarcia@ipla.csic.es (P.G.)

* Correspondence: lucia.fernandez@ipla.csic.es; Tel.: +34-985-89-21-31 (ext. 41)

Received: 2 February 2018; Accepted: 27 February 2018; Published: 28 February 2018

Abstract: Bacteriophages are currently considered as a promising alternative to antibiotics and disinfectants. However, the use of phages in different clinical and industrial settings will involve their exposure to other disinfectants. As a result, the outcome of the phage treatment will depend on two aspects derived from such interactions. On the one hand, the susceptibility of the phage to disinfectants at the concentrations used for disinfection and at lower residual concentrations needs to be determined. Additionally, the existence of synergistic or antagonistic interactions between phages and disinfectants would also affect the potential success of phage biocontrol applications. Here, we tested these effects for the antistaphylococcal phage phiIPLA-RODI by using four different disinfectants: benzalkonium chloride, triclosan, chlorhexidine and hydrogen peroxide. Our results highlight the differences between disinfectants regarding their effect on phage survival and antimicrobial properties. For instance, our data suggests that, out of the four disinfectants used, benzalkonium chloride would be the most adequate to use in settings where phages are to be applied. Nonetheless, this preliminary analysis grants the need for further studies with a larger number of disinfectants for the development of a phiIPLA-RODI-based product.

Keywords: bacteriophages; disinfectants; food industry; *Staphylococcus aureus*

1. Introduction

The use of bacteriophages as antimicrobials was proposed almost 100 years ago by Félix d’Herelle [1]. However, the introduction of antibiotics shortly afterwards temporarily halted the use of the so-called phage therapy in Western countries [2]. In the meantime, bacterial viruses have been isolated and collected in Eastern Europe, where phages have continued to be administered as antibacterials [2]. More recently, due to the relentless increase in bacterial resistance to conventional antimicrobials, the potential use of phages has been reconsidered [2]. As a result, numerous studies are currently investigating the efficacy of bacteriophage-based products to eliminate or reduce bacterial contamination in different settings. One possible application is the use of phage products for disinfection of surfaces in hospital or food industry settings [3–5]. Indeed, some phage-based products have already been developed and placed on the market. For instance, there are two commercial products against *Listeria monocytogenes* contamination, ListShield™ and PhageGuard Listex, which are respectively manufactured by Intralytix Inc. (Baltimore, MD, USA) and Microcos BV (Wageningen, The Netherlands). Similarly, products containing bacteriophages against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* sp. manufactured by Intralytix Inc. have been recently approved by the FDA.

During the application of phage-based surface disinfectants, bacteriophages will almost certainly encounter other antimicrobial compounds that are used as part of routine cleaning and disinfection procedures. With this in mind, analysis of these interactions is an important part of the development of phage-based products. Indeed, the results of such preliminary assessment may determine the selection of a given bacteriophage rather than others or provide information regarding the instructions for the application of the end product or even its composition. For instance, it is very important to determine the susceptibility of bacteriophages to disinfectants for two reasons. On the one hand, we do not want our “phage of choice” to be inactivated due to disinfection protocols performed on the treated surface. This would render our phage product essentially useless in the presence of disinfectants, an information that must be indicated on the product label. On the other hand, due to regulatory constraints, it may be of interest to determine disinfection procedures that can be used to inactivate the phage before using the treated surface. This is important, for example, in the food industry as the authorization approval of certain phage-based products may require that no active phages reach the consumer. In addition to phage susceptibility to disinfectants, another important issue is the potential occurrence of synergistic or antagonistic interactions between the virus and chemical disinfectants. In that sense, the presence of residual concentrations of disinfectants prior to phage application might affect the efficacy of the phage product even if they do not inactivate the viral particles.

To date, the effect of industrial disinfectants on bacteriophages has been studied mostly for viruses that infect lactic acid bacteria [6,7]. This is not surprising since phages have consistently represented a significant source of problems in dairy production [5,8]. Also, a study has evaluated the persistence of phages encoding the Shiga toxin after different disinfection treatments [9]. Overall, these studies seem to indicate that resistance to different disinfectants needs to be examined for each specific bacteriophage. However, there is no current information available regarding the ability of bacteriophages with antimicrobial potential to withstand exposure to biocides. Instead, a few studies have assessed the potential use of bacteriophages in combination with chemical antimicrobials for reducing bacterial contamination [10,11].

The elimination of the recalcitrant biofilms formed by pathogenic bacteria on biotic and abiotic surfaces is perhaps one of the most interesting settings for the use of bacteriophages as disinfectants [4,12]. These structures are resistant to most traditional antimicrobial strategies, making it necessary to design and implement new protocols [13]. In this regard, this study set out to examine the potential interactions between a phage infecting *Staphylococcus aureus* and four selected disinfectants that have distinct chemical structures and/or modes or action. vB_SauM_phiIPLA-RODI (phiIPLA-RODI) is a virulent myophage with known efficacy regarding the removal of biofilms formed by different *S. aureus* strains alone or in combination with other microorganisms [14,15]. Elimination of staphylococcal biofilms is very important within the context of both hospital and industrial settings, as they can represent a serious health threat [4]. In the food industry, for example, *S. aureus* can lead to infections as well as to intoxications due to the production of heat-stable enterotoxins. Therefore, the increased protection of *Staphylococcus* cells inside biofilms against disinfection strategies is a cause of concern. In this scenario, phiIPLA-RODI seems a good candidate for the development of phage-based products against biofilms formed by *S. aureus* on food industry surfaces. Nonetheless, one of the steps involved in developing such products is the assessment of the impact of disinfectants used in the food industry on the effectiveness of phiIPLA-RODI as an antimicrobial and antibiofilm agent. Our results provide preliminary data on this topic and hint that some widely used disinfectants should be avoided in order to ensure the efficacy of products based on phage phiIPLA-RODI.

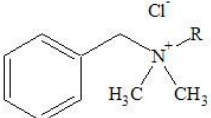
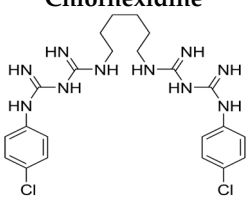
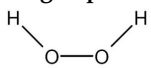
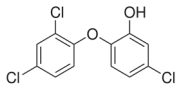
2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains and Phages Used and Growth Conditions

All experiments were performed using *S. aureus* IPLA1 [16] and bacteriophage phiIPLA-RODI [14]. Propagation and titration of the phage were performed as previously described [14]. *S. aureus* was

routinely grown on TSB medium (Tryptic Soy Broth, Scharlau, Barcelona, Spain) at 37 °C in an orbital incubator or on TSA plates, containing TSB supplemented with 2% agar. The disinfectants used were hydrogen peroxide (VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, France), benzalkonium chloride (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA), chlorhexidine digluconate (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and triclosan (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA). All concentrated stocks of disinfectants were prepared in water except triclosan, which was dissolved in 70% ethanol at a concentration of 1 mg/mL. These disinfectants were chosen based on their different chemical structure and mode of action (Table 1) [17]. Moreover, these four compounds are widely used in the formulation of products used for cleaning and disinfection in industrial and/or hospital settings, as well as in products aimed for household cleaning and personal hygiene. As a result, their interaction with bacteriophages would be relevant for the development of phage-based antimicrobial products.

Table 1. Disinfectants chosen for this study.

Disinfectant	Chemical Class	Mode of Action
<p>Benzalkonium chloride</p>  <p>R = -C₈H₁₇ ... -C₁₈H₃₇</p>	Quaternarium ammonium compound (QAC)	Membrane damage
<p>Chlorhexidine</p> 	Biguanide	Membrane damage
<p>Hydrogen peroxide</p> 	Oxidizing agent	Oxidative damage
<p>Triclosan</p> 	Phenolic compound	Membrane disruption, FabI inhibition

2.2. Phage Susceptibility to Different Disinfectants

To determine phage susceptibility to different disinfectants, a phage suspension was diluted to a final concentration of approximately 10⁵ PFU/mL in TSB and different final concentrations of chemical antimicrobial agents or no antimicrobial (control) were added. These suspensions were then incubated overnight at 37 °C. The following day, the surviving phage particles in each sample were determined by the double-layer assay. The survivor particles in the treated samples were compared to the control and used to calculate the percentage of survival. It must be noted that residual amounts of disinfectants in the titrated samples did not inhibit growth of the bacterial lawn.

2.3. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Determination and Checkerboard Assays

Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) values for the disinfectants and the minimum inhibitory multiplicity of infection (MOI) values for the phage was performed according to the broth microdilution technique following the CLSI guidelines [18,19] but using TSB as a growth medium. The MIC, and the minimum inhibitory MOI for the phage, was determined as the lowest

concentration of the antimicrobial that inhibited visible bacterial growth after 24 h of incubation at 37 °C. All MIC assays were repeated 5 to 8 times.

To determine whether there was synergistic or antagonistic interaction between the phage and the disinfectants, the checkerboard method was used [20]. This technique is a modification of the broth microdilution method, in which the bacterium is exposed to two antimicrobials diluted in a two-dimensional fashion. In this case, cell suspensions of *S. aureus* IPLA1 were exposed to combinations of a chemical disinfectant and different concentrations of phage phiIPLA-RODI. Following incubation for 24 h at 37 °C, bacterial growth in the different wells was assessed and used to determine the potential existence of interactions. To do that, the fractional inhibitory concentration (FIC) for each antimicrobial was calculated as described previously [21]. These values were then used to determine the FIC index (FIC_i), which is calculated as the sum of the FICs for a given well. FIC_i values below 0.5 were considered to represent synergy and values above 4.0 were considered an indication of antagonism. Otherwise, it was determined that there was no interaction between the two antimicrobials.

2.4. BIMs

Bacteriophage-insensitive mutants (BIMs) were isolated as previously described [14]. Briefly, overnight cultures of strain *S. aureus* IPLA1 were grown in the presence of subinhibitory concentrations of chlorhexidine at 37 °C with shaking. A control was grown in culture medium alone. 100 µL aliquots from these overnight cultures were taken (10^8 CFU) and incubated with 100 µL of phage stock (10^9 PFU) for 10 min at 37 °C. Then, this mixture was combined with 3 mL of soft agar and poured onto thin TSA plates. These plates were incubated overnight at 37 °C. The number of surviving colonies was counted the following day to calculate the frequency of BIMs by dividing this number by the initial number of bacteria inoculated on the plate.

2.5. Phage Adsorption Rate

To determine the phage adsorption rate, an overnight culture of *S. aureus* IPLA1 was diluted 1:100 into fresh TSB medium containing different concentrations of chlorhexidine (0, 0.25 and 0.5 µg/mL) and grown to an OD₆₀₀ of 1. 900 µL aliquots from these cultures ($\sim 10^8$ CFU/mL) were then mixed with 100 µL of a phage stock containing 10^7 PFU/mL (MOI = 0.1). A control sample was prepared by mixing 900 µL of sterile TSB with 100 µL of phage stock. All samples were incubated for 5 min at room temperature to allow for phage adsorption to occur. After incubation, samples were centrifuged for 3 min at $10,000 \times g$ at 4 °C and the supernatants were collected and titrated following the double layer technique to determine the number of non-adsorbed phages. The phage adsorption rate for each sample was calculated by using the following formula: phage adsorption rate = [(phage number in supernatant of control – phage number in supernatant sample)/(phage number in supernatant of control)] \times 100.

2.6. Biofilm Formation and Treatment Assays

In order to perform the biofilm treatment assays, biofilms were first preformed. Thus, overnight cultures of *S. aureus* IPLA1 were diluted down in TSB supplemented with 0.25% glucose to obtain a cell suspension containing 10^6 CFU/mL. 200 µL from this suspension was used to inoculate each well of a Nunclon Delta polystyrene 96-well microtitre plate (Thermo Scientific, NUNC, Madrid, Spain). Following incubation at 37 °C for 24 h, the planktonic phase was removed from the wells and the biofilms were washed twice with PBS. Then, TSB containing different combinations of disinfectant concentrations plus bacteriophage (10^9 PFU/mL) were added to the wells. Treatment was performed for 24 h at 37 °C. After treatment, the biofilm was washed again with PBS and subsequently stained with crystal violet as previously described [22]. Briefly, 200 µL of 0.1% crystal violet were added to each well and subsequently removed after incubation for 15 min at room temperature. Then, the excess dye was removed by washing twice with distilled water. Finally, 200 µL of 33% acetic acid was added to each well to solubilize the dye prior to quantification by measuring A₅₉₅ in a Benchmark Plus microplate

spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Biofilm removal was determined as the percentage of biomass found in samples treated with phage and/or disinfectant compared to the biomass of the untreated control (treated with medium alone) according to the equation $[A_{595}(\text{treated sample})/A_{595}(\text{untreated control sample})] \times 100$.

2.7. Statistical Analysis

Data obtained from at least three independent biological replicates were analyzed with a two-tailed Student's *t* test. *p*-Values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Susceptibility of Phage phiIPLA-RODI to Different Disinfectants

3.1.1. Susceptibility at Concentrations Used in Household and Industrial Products

The first objective of this study was to determine whether four different antimicrobial compounds led to the inactivation of the *S. aureus* phage phiIPLA-RODI. The compounds selected for this analysis were: benzalkonium chloride, chlorhexidine, hydrogen peroxide and triclosan, four disinfectant agents belonging to different chemical classes (Table 1). The concentrations tested are in the range of those present in commercial products aimed for household or industrial disinfection procedures. In most cases, overnight incubation with these disinfectants led to inactivation of the phage particles in the suspension to undetectable levels (Table 2). One exception was 0.02% chlorhexidine, a concentration used in catheter maintenance solutions, in which 96.33% of the phage particles were inactivated. Likewise incubation in triclosan at 0.03% or 0.003% led to inactivation of 97.37% and 78% of the phage particles, respectively.

Table 2. Survival of phage phiIPLA-RODI in the presence of disinfectants.

Disinfectant	Concentration	% Survival Compared to Untreated Control
Benzalkonium chloride	0.002% (20 µg/mL)	<0.02
	0.02% (200 µg/mL)	<0.02
	5% (50 mg/mL)	<0.02
Chlorhexidine	0.02% (200 µg/mL)	3.67 ± 2.07
	0.2% (2 mg/mL)	<0.02
Hydrogen peroxide	0.3% (80 mM)	<0.02
	3% (0.8 M)	<0.02
Triclosan	0.003% (30 µg/mL)	22.00 ± 7.21
	0.03% (300 µg/mL)	2.63 ± 0.94

3.1.2. Susceptibility at Disinfectant Concentrations Near the MIC of the Host Bacterium

Before studying the susceptibility of phiIPLA-RODI to low concentrations of the disinfectants, it was necessary to assess the susceptibility of *S. aureus* IPLA1 to the four compounds. The determined MIC values for benzalkonium chloride, triclosan, chlorhexidine and hydrogen peroxide were 1 µg/mL, 0.25 µg/mL, 2 µg/mL and 0.6 mM, respectively.

Taking these values into account, we tested the viability of the phage following incubation with antimicrobial concentrations near and below their respective MICs. In this range, the results were quite different from those observed in the previous experiment (Figure 1). Indeed, no major decrease in phage survival (more than one logarithmic unit) was observed for most of the concentrations used in the test. A notable exception to this is hydrogen peroxide, which can significantly inactivate the phage at doses near the MIC for *S. aureus* IPLA1 (Figure 1d). In fact, a decrease of more than 4 or 5 logarithmic units was observed at 0.6 and 1.25 mM, respectively. For chlorhexidine, however, none of the concentrations used here led to a significant reduction in phage counts (Figure 1c). In the

case of benzalkonium chloride, only a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ led to a minor decrease in phage survival (Figure 1a). Finally, triclosan led to small reductions (<90%) in phage survival at different concentrations, more specifically at 0.015, 0.03 and 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 1b).

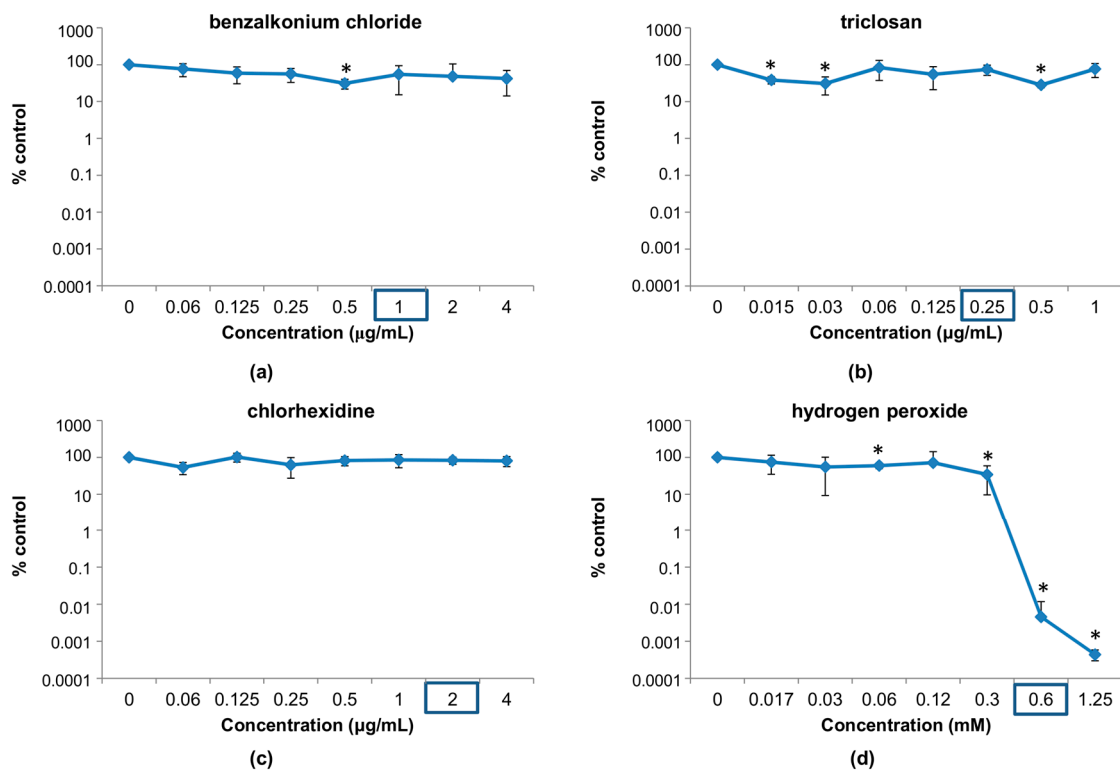


Figure 1. Percentage of survival of phiIPLA-RODI phage particles after overnight treatment with different concentrations of disinfectants: (a) benzalkonium chloride; (b) triclosan; (c) chlorhexidine; (d) hydrogen peroxide compared to an untreated control without disinfectant. The minimal inhibitory concentrations (MIC) for *S. aureus* IPLA1 for each disinfectant is marked with a blue rectangle. * p -Value < 0.05.

3.2. Interactions between Phage phiIPLA-RODI and Disinfectants

Besides affecting phage viability, the presence of chemical disinfectants may alter the antimicrobial effect of the bacteriophage either positively (synergy) or negatively (antagonism). This phenomenon would have an impact on the efficacy of phage-based products. Therefore, it is important to establish the existence of such interactions between a specific bacteriophage and different disinfectants that it may encounter during its application. With this in mind, we tested if residual concentrations of the four disinfectants used in this study affected the outcome of bacteriophage-bacteria interactions. Our results varied depending on the specific disinfectant (Figure 2). First of all, it must be noted that the presence of the phage did not affect susceptibility of *S. aureus* IPLA1 to any of the four disinfectants tested. In contrast, some of the disinfectants did alter the ability of the phage to inhibit bacterial growth. The most obvious changes were observed in the presence of chlorhexidine, an antimicrobial that did not have an impact on phage survival after overnight incubation (Figure 1c). In spite of this, subinhibitory doses of chlorhexidine led to an increase in the MIC to phiIPLA-RODI, thereby indicating the existence of antagonism between the virus and the disinfectant (Figure 2c). Indeed, $1/2 \times \text{MIC}$ increased resistance to the phage by 100-fold. In the case of triclosan and hydrogen peroxide, some subinhibitory concentrations increased the MIC to phage phiIPLA-RODI by 10-fold (Figure 2b,c). However, it must be noted that, unlike chlorhexidine, these two compounds did affect phage survival (Figure 1b,c). Consequently, the results observed in the checkerboard assays may reflect this loss of viability after incubation of the phage with the disinfectants. Finally, the quaternary ammonium

compound benzalkonium chloride did not have an impact on bacterial susceptibility to the virus (Figure 2a). The FIC index calculated for benzalkonium chloride and the phage was 2, which indicates no interactions between the two antimicrobials. In contrast the FIC index for the other disinfectants and the phage was 11, indicative of antagonism.

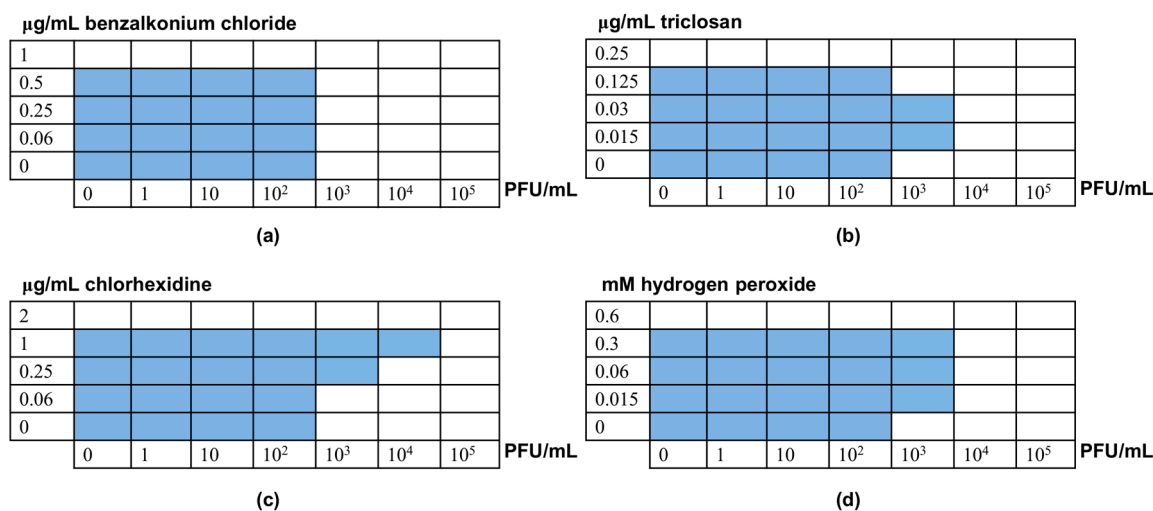


Figure 2. Results of the checkerboard assays to test the interactions between phage phiIPLA-RODI and the following disinfectants: (a) benzalkonium chloride; (b) triclosan; (c) chlorhexidine; (d) hydrogen peroxide. Wells with bacterial growth after 24 h of incubation at 37 °C are marked in blue.

Since the result observed for chlorhexidine could not be explained by reduced survival of the phage due to the disinfectant, we tried to identify the mechanism behind the antagonistic effect between the two antimicrobials. One of the possible explanations would be that exposure to subinhibitory concentrations of chlorhexidine increases the frequency of BIMs in the bacterial population, leading to greater resistance to the phage. However, the average frequency of BIMs did not vary significantly in populations exposed to 0.25 µg/mL, 0.5 µg/mL or 1 µg/mL of chlorhexidine compared to the control sample without antimicrobial (Table 3). Another potential explanation for this phenomenon may be that exposure to subinhibitory chlorhexidine affects the bacterial cell in such a way that phage adsorption is limited. We tested this hypothesis by growing *S. aureus* IPLA1 in two subinhibitory concentrations of chlorhexidine that did not significantly affect bacterial growth or decrease phage viability. The results did not show any significant change in the phage adsorption rate in the samples grown with the disinfectant (Table 3).

Table 3. Effect of chlorhexidine on frequency of BIMs and phage adsorption rate of phiIPLA-RODI.

Chlorhexidine Concentration	BIM Frequency	Phage Adsorption Rate
0 µg/mL	3.79×10^{-7}	87.22 ± 3.16
0.25 µg/mL	3.55×10^{-7}	84.08 ± 14.17
0.5 µg/mL	3.09×10^{-7}	89.00 ± 5.36
1 µg/mL	2.34×10^{-7}	Not determined

These results highlight that the interactions between bacteriophages and chemical antimicrobials may vary and do not always correlate with the susceptibility of the phage particles to a specific compound. As evidenced by the results obtained for chlorhexidine, bacterial cells may exhibit differences in phage susceptibility when exposed to subinhibitory concentrations of certain disinfectants. Further work is still necessary, however, to determine the specific mechanisms involved in this phenomenon.

3.3. Elimination of *S. aureus* Biofilms by Combinations between Phage phiIPLA-RODI and Disinfectants

In the previous experiment, we explored how different combinations of a bacteriophage and disinfectants affect antimicrobial activity of the phage on planktonic cells in a standard broth microdilution method. However, these interactions may be different when it comes to biofilm elimination. To examine this possibility, preformed 24-h biofilms of *S. aureus* IPLA1 were treated with different combinations of phiIPLA-RODI and the four disinfectants (Figure 3). An initial observation of the results reveals that, out of the four disinfectants, triclosan and hydrogen peroxide seem to be the least effective for biofilm removal (Figure 3b,d), followed by benzalkonium chloride (Figure 3a) and chlorhexidine (Figure 3c), with the latter showing very good antibiofilm activity at all concentrations tested. Of note, treatment with higher doses of benzalkonium chloride was less effective for biofilm elimination than lower concentrations. Indeed concentrations of 12.5 µg/mL and 25 µg/mL led to a reduction in attached biomass of approximately 80%, whereas concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL decreased biofilm by ~40–60% (Figure 3a). Perhaps, despite the bactericidal activity of the disinfectant, these concentrations promote biofilm formation; thereby resulting in a lesser reduction of the attached biomass. Triclosan was only effective for biofilm removal at the highest concentration tested (50 µg/mL), with an elimination of approximately 60% of the biomass (Figure 3b). Lower concentrations showed no reduction at all (6.25 µg/mL) or only slight reductions of up to 40–50%, with high variability between experiments, at 12.5 µg/mL and 25 µg/mL. Biofilm removal by chlorhexidine was about 80% for all concentrations analyzed (Figure 3c), while the average biomass reduction with hydrogen peroxide was approximately 50–60% at concentrations between 7.5 and 60 mM (Figure 3d).

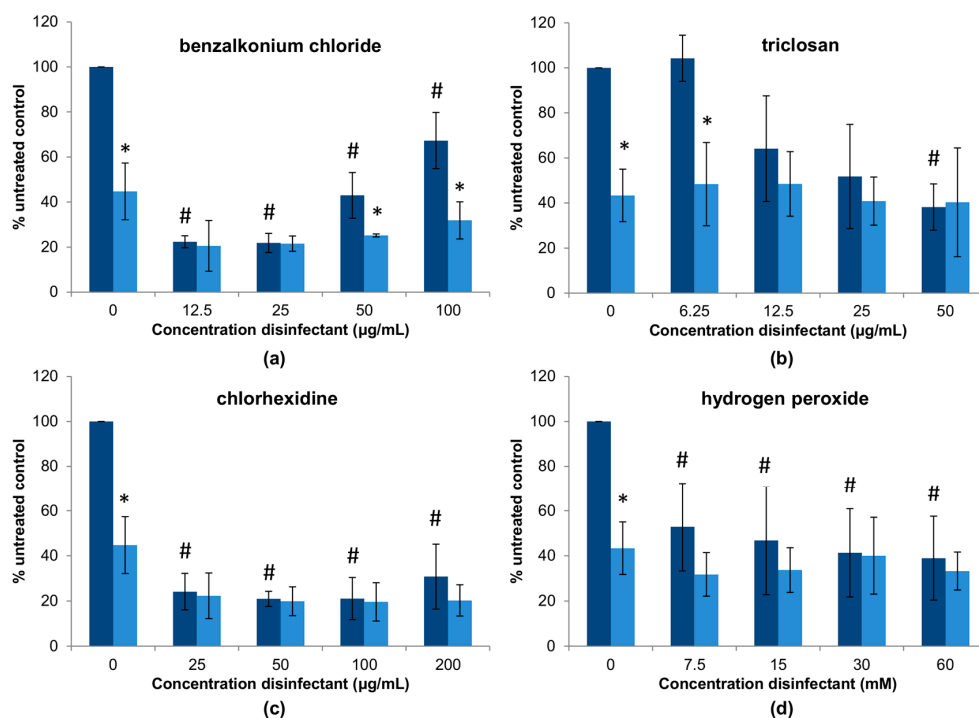


Figure 3. Representation of the data obtained in the biofilm removal assays to test the interactions between a high dose of phage phiIPLA-RODI (10^9 PFU/mL) and different concentrations of the following disinfectants: (a) benzalkonium chloride; (b) triclosan; (c) chlorhexidine; (d) hydrogen peroxide. Dark blue and light blue bars represent samples without or with phage treatment. Values obtained without phage treatment were compared to those treated with phiIPLA-RODI and p -values < 0.05 were considered significant (*). Additionally, values obtained with disinfectant were compared to the untreated control to determine the antibiofilm effects of the four antimicrobials and p -values < 0.05 were considered significant (#).

Treatment with the phage alone, without disinfectant, led to a decrease in attached biomass of approximately 43% compared to the untreated control. In most cases, adding the virus did not significantly improve treatment with the chemical disinfectants. However, there are some exceptions to this. For instance, combination of the phage with benzalkonium chloride significantly improved treatment at higher concentrations (50 µg/mL and 100 µg/mL) of the disinfectant (Figure 3a). Therefore, addition of phiIPLA-RODI could counteract the reduced efficacy of benzalkonium chloride at these doses compared to lower concentrations. Regarding triclosan, the lowest concentration tested (6.25 µg/mL) did not exert a significant ability to eliminate biofilms (Figure 3b). In contrast, that same concentration together with phiIPLA-RODI did, with a difference akin to that obtained with the bacteriophage alone. This suggested that the virus was not significantly affected by the chemical during biofilm treatment even though the phage was inactivated by the same range of triclosan concentrations when incubated in a suspension (Table 2). It is thus possible that the viral particles are protected from the antimicrobial agent by the extracellular matrix or inside host cells. Alternatively, phage infection and propagation might occur at a faster rate than phage inactivation by triclosan, thereby balancing out the virucidal effect of the disinfectant. In the case of chlorhexidine and hydrogen peroxide, the presence of the phage did not alter the efficacy of the disinfectants (Figure 3c,d).

Taken together, all these assays show that, in order to get a clear picture of the interactions between bacteriophages and disinfectants, it is important to examine such interactions from different perspectives. Thus, in addition to assessing phage susceptibility to a given compound, it is necessary to determine how the virus and the chemical agent will mutually affect each other in the presence of bacterial cells. Moreover, the interplay between disinfectants, phages and bacteria has to be analyzed for planktonic and biofilm cells given the notable differences between these two states.

4. Discussion

Bacteriophages have great potential as antimicrobial agents. Their specificity, together with their safety regarding human health and the environment, makes them a very interesting option to complement routine cleaning and disinfection procedures. However, the use of bacterial viruses in industrial and medical settings will necessarily involve their interaction with chemical disinfectants. Such interactions may affect the efficacy of bacteriophages as antimicrobials and, as a result, should be examined prior to the development of phage-based products. With this in mind, this study aimed to obtain some preliminary information regarding the effect of four common chemical disinfectants on a promising antistaphylococcal phage. Previous studies had shown that virulent phage phiIPLA-RODI is able to infect and lyse a wide range of *S. aureus* strains, not only during planktonic growth but also when forming biofilms, even with other species [14,15].

One of the aspects explored here is the susceptibility of phiIPLA-RODI to four disinfectants with different chemical structures. To date, most information regarding phage susceptibility to disinfectants has been gathered for phages infecting lactic acid bacteria (LAB), which are a problem in the dairy industry [6,7]. Conversely, information on the efficacy of commonly used biocides against phages that inactivate bacterial pathogens is scarce. Our results showed that exposure of phiIPLA-RODI to concentrations in the range of industrial or household biocidal products led to significant reductions in the numbers of surviving viral particles. However, there were notable differences between antimicrobial agents regarding their antiviral properties. Thus, benzalkonium chloride and hydrogen peroxide eliminated the virus to undetectable levels at all concentrations tested, whereas some concentrations of chlorhexidine and triclosan did not. In contrast, when the phage was challenged with lower, residual concentrations of the disinfectants, closer to the MIC of the bacterium, only hydrogen peroxide led to a major reduction (>99%) in the number of viral particles. Interestingly, QACs and oxidizing agents were the most effective against several LAB phages [6]. In another study, the most effective biocide against lactococcal phages was benzalkonium chloride followed by hydrogen peroxide, whereas other biocides were only active against some phages [7]. Despite the apparent trends of certain disinfectants to be more effective for the inactivation of bacteriophages, it does seem

evident that this is a property that needs to be examined for each phage with antimicrobial potential. In view of our results, it seems that phage-based products should not be applied together with chemical disinfectants at routine working concentrations, although lower doses of the biocides can be tolerated by the phage while retaining considerable antibacterial activity. It can also be pointed out that biocidal treatment with benzalkonium chloride or hydrogen peroxide could be used to inactivate the phage in order to comply with the strict current regulations regarding phage applications. As a result of this, no viable phage particles would reach, for example, food products that subsequently come into contact with the phage-treated surfaces.

Given the fact that low concentrations of most antimicrobial agents tested are rather innocuous for the phage, it seemed interesting to explore the existence of potential synergistic interactions against planktonic cells of *S. aureus*. However, the data obtained in checkerboard assays showed no such synergy. Indeed, some antimicrobials demonstrated an additive effect with the phage, while others exhibited a clear antagonism. In some cases, the observed antagonism may be a result of partial phage inactivation by the biocide at the concentrations tested, as is the case of hydrogen peroxide and triclosan. Surprisingly, the most clear antagonistic interaction occurred between phiIPLA-RODI and chlorhexidine, despite the fact that low concentrations of this disinfectant did not alter phage particle viability. This result suggests the existence of a secondary effect of chlorhexidine that interferes with the development of phage infection. Our results suggest that this phenomenon is not due to an increased presence of phage resistant mutants or to a decrease in the adsorption rate when bacteria have been exposed to chlorhexidine. However, regardless of the mechanism responsible for the antagonism observed, it seems that chlorhexidine, even at very low concentrations, should not be used in environments where phage treatment is to be performed.

Given the relevance of biofilms formed on different biotic and abiotic surfaces, the interactions between the bacteriophage and the disinfectants regarding biofilm removal were also assessed. In general, our results confirm the potential of phiIPLA-RODI for eliminating biofilms formed by *S. aureus* observed in previous studies [14,15]. Moreover, the viral particles seemed to withstand higher concentrations of disinfectants when infecting bacterial biofilms compared to liquid cultures. Thus, the biofilm architecture appears to protect not only bacterial cells, but also their predator phages, from antimicrobial agents. In most of the combinations used, there was no significant change from the presence of the two antimicrobials, phage and chemical agent. However, the bacteriophage improved removal when combined with some concentrations of triclosan or benzalkonium chloride.

Overall, the results obtained in this study have highlighted the importance of evaluating the impact of cleaning and disinfecting agents on the efficacy of a phage-based antimicrobial product. Moreover, the data presented here provide hints regarding the design and label indications for the production of a new antimicrobial based on phiIPLA-RODI against *S. aureus*. Nonetheless, the diversity of the responses depending on the specific disinfectant and its concentration also indicates that this preliminary study deserves to be followed by further analysis including more disinfectants.

Acknowledgments: This study was supported by grants AGL2015-65673-R (Ministry of Science and Innovation, Spain), Proyecto Intramural CSIC 201770E016, EU ANIWA ERA-NET (BLAAT ID: 67), GRUPIN14-139 (Program of Science, Technology and Innovation 2013–2017 and FEDER EU funds, Principado de Asturias, Spain). Pilar García, Beatriz Martínez and Ana Rodríguez are members of the FWO Vlaanderen funded “Phagebiotics” research community (WO.016.14) and the bacteriophage network FAGOMA II. We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

Author Contributions: Pilar García, Ana Rodríguez, Beatriz Martínez and Lucía Fernández conceived and designed the experiments; Seila Agún, Lucía Fernández and Eva González-Menéndez performed the experiments; Seila Agún, Eva González-Menéndez and Lucía Fernández analyzed the data; Seila Agún, Eva González-Menéndez, Pilar García, Ana Rodríguez, Beatriz Martínez and Lucía Fernández wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. D'Herelle, F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *CR Acad. Sci. Paris* **1917**, *165*, 373–375.
2. Abedon, S.T.; Kuhl, S.J.; Blasdel, B.G.; Kutter, E.M. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* **2011**, *1*, 66–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ivanova, K.; Ramon, E.; Hoyo, J.; Tzanov, T. Innovative approaches for controlling clinically relevant biofilms: Current trends and future prospects. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*, 1889–1914. [[CrossRef](#)]
4. Gutiérrez, D.; Rodríguez-Rubio, L.; Martínez, B.; Rodríguez, A.; García, P. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Fernández, L.; Escobedo, S.; Gutiérrez, D.; Portilla, S.; Martínez, B.; García, P.; Rodríguez, A. Bacteriophages in the dairy environment: From enemies to allies. *Antibiotics* **2017**, *6*, E27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Campagna, C.; Villion, M.; Labrie, S.J.; Duchaine, C.; Moineau, S. Inactivation of dairy bacteriophages by commercial sanitizers and disinfectants. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *171*, 41–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Hayes, S.; Murphy, J.; Mahony, J.; Lugli, G.A.; Ventura, M.; Noben, J.P.; Franz, C.M.; Neve, H.; Nauta, A.; van Sinderen, D. Biocidal inactivation of *Lactococcus lactis* bacteriophages: Efficacy and targets of commonly used sanitizers. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. De Melo, A.G.; Levesque, S.; Moineau, S. Phages as friends and enemies in food processing. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *49*, 185–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Allué-Guardia, A.; Martínez-Castillo, A.; Muniesa, M. Persistence of infectious Shiga toxin-encoding bacteriophages after disinfection treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 2142–2149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Sukumaran, A.T.; Nannapaneni, R.; Kiess, A.; Sharma, C.S. Reduction of *Salmonella* on chicken meat and chicken skin by combined or sequential application of lytic bacteriophage with chemical antimicrobials. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *207*, 8–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Chaitiemwong, N.; Hazeleger, W.C.; Beumer, R.R. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by disinfectants and bacteriophages in suspension and stainless steel carrier tests. *J. Food Prot.* **2014**, *77*, 2012–2020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Pires, D.P.; Melo, L.; Vilas Boas, D.; Sillankorva, S.; Azeredo, J. Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Curr. Opin. Microbiol.* **2017**, *39*, 48–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. De la Fuente-Núñez, C.; Reffuveille, F.; Fernández, L.; Hancock, R.E.W. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, *16*, 580–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gutiérrez, D.; Vandenheuvel, D.; Martínez, B.; Rodríguez, A.; Lavigne, R.; García, P. Two Phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, lyse mono- and dual-species staphylococcal biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 3336–3348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. González, S.; Fernández, L.; Campelo, A.B.; Gutiérrez, D.; Martínez, B.; Rodríguez, A.; García, P. The behavior of *Staphylococcus aureus* dual-species biofilms treated with bacteriophage phiIPLA-RODI depends on the accompanying microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *83*, e02821-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gutiérrez, D.; Delgado, S.; Vázquez-Sánchez, D.; Martínez, B.; Cabo, M.L.; Rodríguez, A.; Herrera, J.J.; García, P. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 8547–8554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. McDonnell, G.; Russell, A.D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 147–179. [[PubMed](#)]
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 7th ed.; Approved Standard M7-A7; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2006.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; CLSI Approved Standard M100-S17; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2007.
20. Dougherty, P.F.; Yotter, D.W.; Matthews, T.R. Microdilution transfer plate technique for determining in vitro synergy of antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 225–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Elion, G.B.; Singer, S.; Hitchings, G.H. Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. *J. Biol. Chem.* **1954**, *208*, 477–488. [[PubMed](#)]
22. Gutiérrez, D.; Ruas-Madiedo, P.; Martínez, B.; Rodríguez, A.; García, P. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1 La metodología de superficie de respuesta permite optimizar la propagación de fagos en hospedadores alternativos no patógenos

El potencial que ofrecen los bacteriófagos como antimicrobianos tanto en el sector clínico (terapia fágica) como en el alimentario (biocontrol) exige procesos de producción de fagos a gran escala, utilizando biorreactores estrictamente controlados (Vandamme & Mortelmans, 2019). La información sobre los parámetros clave y las variables de estos procesos son empíricos y, a menudo, los que ya están descritos se encuentran patentados. Además, en la mayoría de los casos es preciso adaptar los resultados de escalado para cada bacteriófago, teniendo en cuenta además que la aprobación comercial de los productos exige que sean seguros, reproducibles y efectivos (Fernández et al., 2018; Vandamme & Mortelmans, 2019).

El bacteriófago philPLA-RODI ha sido ampliamente caracterizado en nuestro laboratorio y por sus propiedades (fago virulento, amplio rango de huésped, alta actividad lítica frente a células planctónicas y en biofilms) es un buen candidato para ser utilizado como antimicrobiano en varias aplicaciones. En este contexto, decidimos optimizar su propagación a escala de laboratorio y sentar así las bases para una futura producción a escala industrial. Inicialmente, buscamos un hospedador alternativo a *S. aureus*, que en este caso fue *S. xyloso*, para minimizar el riesgo que implicaría manejar grandes cantidades de esta bacteria patógena, así como la posterior purificación de los fagos libres de sus contaminantes. Por otro lado, el uso de la metodología de superficie de respuesta (MSR), no sólo nos permitió identificar la temperatura y la concentración bacteriana inicial, como variables significativas en la propagación del fago philPLA-RODI, sino que también permitió establecer qué condiciones de las mismas, conseguían optimizar la ligera disminución que se produjo en el título fágico final cuando el fago se propagó en *S. xyloso*, e incluso mejorarlas.

Elegimos como hospedador una bacteria de grado alimentario para, de esta manera, dar cumplimiento a los requisitos de calidad y seguridad que se requerirían para la futura comercialización de los preparados fágicos (Pirnay et al., 2015). El amplio rango de hospedador del fago philPLA-RODI permitió seleccionar la cepa *S. xyloso* CTC1642 de origen cárnico, por su sensibilidad al mismo. Además, se confirmó que la progenie

Discusión

resultante de la propagación en esta especie era idéntica, en valores de EOP, rango de hospedador y capacidad anti-biofilm, a aquella obtenida en el hospedador inicial *S. aureus* IPLA1. Resultados semejantes se habían observado para los fagos Team1, phi812 y K, al ser propagados en diferentes hospedadores (El Haddad et al., 2014). Por otro lado, se evidenció una ligera disminución en el título fágico final cuando phiPLA-RODI se propagó en *S. xylosus* ($8,2 \pm 0,2 \log_{10}$ UFP/mL versus $8,9 \pm 0,1 \log_{10}$ UFP/mL), lo que se atribuyó al menor tamaño de explosión calculado en esta especie en comparación con *S. aureus* (10 frente a 25 partículas fágicas por célula infectada). Estudios previos habían descrito también una variación en el tamaño de explosión de algunos fagos al utilizar otra cepa hospedadora no patógena. Así, el fago Team1 incrementó el tamaño de explosión de 31 UFP por célula infectada en *S. aureus* SA812 a 37,5 UFP por célula infectada en *S. xylosus* SMQ-121 (El Haddad et al., 2014), mientras que el fago PVP-SE1 pasó de 102 a 28 UFP por célula infectada al cambiar de *Salmonella* S1400/94 a *E. coli* BL21 no patógena (Santos et al., 2010).

Para superar esta limitación al utilizar un hospedador no patógeno, se llevó a cabo la optimización del proceso de producción del bacteriófago phiPLA-RODI en *S. xylosus* mediante el uso de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), ya utilizada con éxito para mejorar la producción de fagos filamentosos que infectan a *E. coli* (Grieco et al., 2012). De hecho, el número de estudios sobre la producción de bacteriófagos basados en modelos predictivos ha proliferado en los últimos años e incluso algunos de ellos han sido validados experimentalmente (García et al., 2019).

La propagación de un fago implica la sucesión de varios ciclos de infección, que dependen de un gran número de factores: los parámetros de infección (tasa de adsorción, período de latencia y tamaño de explosión), el crecimiento bacteriano, la interacción fago-hospedador y otros factores ambientales. Todos ellos determinarán el rendimiento fágico del proceso (Hyman & Abedon, 2009; Santos et al., 2014). Además, existen evidencias sobre la influencia de la temperatura, el pH, el tiempo de propagación, el tipo de cultivo y la forma de alimentación de los biorreactores (continuo o discontinuo), en el título fágico final (Grieco et al., 2012; Warner et al., 2014). También se ha estudiado cómo la concentración bacteriana y fágica, el estado fisiológico bacteriano y la cantidad de nutrientes afectan al proceso productivo (Nabergoj et al., 2018; Santos et al., 2014).

En nuestro estudio, seleccionamos inicialmente como factores o variables independientes la concentración de fagos y bacterias, temperatura y agitación, para buscar aquellas condiciones que maximizan el rendimiento fágico. Los resultados mostraron que la agitación no afectaba al rendimiento del fago dentro del rango estudiado (20-250 rpm);

no obstante, se fijó a un nivel intermedio (135 rpm) para ensayos posteriores, con el objetivo de evitar la sedimentación de la población bacteriana y favorecer el encuentro entre bacterias y fagos. Éstos últimos actúan como partículas inertes que dependen del movimiento browniano aleatorio en sus interacciones con las bacterias, no siendo capaces de realizar una búsqueda activa (Kasman et al., 2002).

En relación a la temperatura, los primeros ensayos se realizaron en un rango de temperatura (21–37°C), sin mostrar una mejora en el título fágico final de phiPLA-RODI, a diferencia de otros estudios donde se habían obtenido valores de temperatura por debajo del óptimo para el crecimiento del hospedador, que favorecían el rendimiento fágico (Grieco et al., 2012; Tokman, Kent, Wiedmann, & Denes, 2016). De hecho, se ha evidenciado que el proceso de infección del fago depende en gran medida de la maquinaria metabólica del hospedador bacteriano, por lo que una temperatura que mejore la actividad metabólica dará como resultado un mejor rendimiento del proceso de propagación del fago (Binetti et al., 2002; Quiberoni & Reinheimer, 1998; Watanabe et al., 1993). Los datos observados en un rango de temperatura superior (34–40°C), no sólo mejoraron los resultados, sino que mostraron un efecto cuadrático para la temperatura, con un óptimo a 38°C, cercano en este caso al óptimo de crecimiento de su hospedador.

También la concentración bacteriana inicial tuvo un efecto cuadrático, mientras que el efecto de la concentración inicial de fagos no fue estadísticamente significativo en las condiciones ensayadas (135 rpm, 38°C). Este resultado pone en valor la importancia de no utilizar la MOI (relación fago/bacteria) como variable independiente, ya que se obtienen valores de MOI iguales a partir de diferentes concentraciones de fagos y bacterias iniciales, por lo que es más recomendable indicar concentraciones iniciales de bacterias y fagos (Abedon, 2016). Los rangos de ambas variables se establecieron teniendo en cuenta que, para un proceso de infección eficiente, se debe producir un aumento del título inicial de fagos, para lo cual, la población bacteriana inicial debe exceder su umbral de proliferación ($\sim 10^4 \log_{10}$ UFC/ml). Cuando se supera ese valor, se entiende que la probabilidad de que se encuentren un fago libre y una bacteria susceptible de ser infectada excede la probabilidad de que el fago se diluya en el sistema (Payne & Jansen, 2003). La superficie de respuesta obtenida mostró como dentro del rango de valores estudiados, el rendimiento de fagos va aumentando hasta su óptimo, a medida que va aumentando la concentración bacteriana inicial. No obstante, también se observó una fuerte disminución del rendimiento de fagos a concentraciones bacterianas iniciales superiores a $7,5 \log_{10}$ UFC/ml. Este comportamiento podría deberse a que una parte de la nueva progenie viral se adsorbe a las bacterias hospedadoras que no fueron infectadas inicialmente, lo que podría dificultar

Discusión

su detección mediante la titulación de fagos. Tal comportamiento también se puede explicar por la disminución de los nutrientes disponibles debido al aumento de la población bacteriana. Durante el proceso habría una disminución de la tasa de crecimiento de las bacterias que a su vez disminuiría la tasa de adsorción, provocando menos infecciones y, en consecuencia, menos progenie fágica (Santos et al., 2014).

Dependiendo de las interacciones de cada binomio fago-hospedador, puede ser necesario ajustar la concentración del hospedador y del fago para obtener un equilibrio adecuado entre el crecimiento celular y la propagación de los fagos. Por ejemplo, los fagos que tienen un período latente largo o un tamaño de explosión pequeño tardan más en amplificarse, por lo que, si las células crecen demasiado rápido, el cultivo no se lisará completamente y el rendimiento del fago (título) probablemente será bajo. Por otro lado, una concentración inicial del fago muy superior a la del hospedador dará como resultado una lisis rápida del inóculo inicial, limitando nuevas rondas de infección para la progenie, y reduciendo así el rendimiento final (Fortier & Moineau, 2009).

Finalmente, gracias a la aplicación de la MSR, se ha conseguido incrementar el título fágico del bacteriófago phiPLA-RODI propagado en *S. xylosus* hasta en 11 veces (desde $1,6 \times 10^8$ a $1,8 \times 10^9$ UFP/ml) respecto al proceso antes de la optimización. Este resultado es mejor que otros previamente descritos, como por ejemplo, el obtenido para fagos filamentosos de *E. coli* con un incremento de hasta 7 veces el título fágico final con respecto a las condiciones habituales de producción (Grieco et al., 2012). Además, en nuestro caso pudimos maximizar el rendimiento y la relación de amplificación del fago (es decir, las veces que la población de fagos se multiplica en unidades \log_{10} durante el proceso de propagación), minimizando la concentración inicial del fago y aplicando las siguientes condiciones óptimas: inóculo de bacterias inicial de $7,07 \log_{10}$ CFU/ml, título inicial de fagos de $6,00 \log_{10}$ UFP/ml, agitación a 135 rpm y temperatura de 38°C. Usando estas condiciones, se obtiene un rendimiento de fago de hasta $9,25 \pm 0,35 \log_{10}$ UFC/ml, lo que representa una relación de amplificación de fagos de $2,72 \pm 0,90$ unidades logarítmicas sobre el título inicial, utilizando un hospedador no patógeno.

2 Técnicas de conservación y formulación para fagos de *Staphylococcus* en función de su aplicación final

La conservación de bacteriófagos a largo plazo sigue siendo una cuestión sin resolver, debido a la inestabilidad estructural de los viriones en determinadas condiciones de almacenamiento. Además, los estudios realizados hasta la fecha indican que no existe un método universal para su conservación, debido a las diferentes sensibilidades que presentan los fagos de manera individual, cuando son sometidos a técnicas de formulación y/o almacenamiento (Fortier & Moineau, 2009; Ackermann et al., 2004). De hecho, se requiere el uso de agentes protectores específicos que mejoren la estabilidad de los bacteriófagos, tanto durante el procesamiento en la obtención de formulaciones (liofilización, secado por pulverización, incorporación de fagos en matrices de polímeros biodegradables o micropartículas), como durante su posterior almacenamiento, y cuya efectividad difiere según el tipo de fago. Por otra parte, es habitual que las preparaciones fágicas requieran el almacenamiento en frío, lo que incrementa el coste y limita las posibilidades de su manejo y transporte (Vandenheuvel et al., 2015), por lo que la búsqueda de técnicas que garanticen su conservación a temperatura ambiente, al menos durante un tiempo limitado, facilitarían su comercialización.

En los laboratorios de investigación los fagos se guardan normalmente en pequeños volúmenes, por lo que los métodos de conservación más utilizados son el almacenamiento de lisados a 4°C, o congelados a bajas temperaturas (-20°C, -80°C o -196°C) mediante el uso de algún agente crioprotector. De hecho, el almacenamiento a baja temperatura es el método utilizado habitualmente en colecciones públicas que mantienen existencias de fagos durante largos períodos de tiempo. Sin embargo, estos métodos de conservación no son adecuados cuando se pretende manejar grandes volúmenes de fagos destinados a su comercialización. Existen para ello otros métodos más adecuados como son la liofilización o el secado por pulverización, que ofrecen la ventaja de producir un polvo seco que puede almacenarse y transportarse fácilmente, con la limitación de sufrir una disminución del título fágico, debido principalmente al proceso de secado, por lo que también para la aplicación de estas técnicas resulta necesario el uso de crioprotectores.

Por tanto, con la idea de ofrecer una visión más global, se han incluido en el estudio, cuatro fagos caracterizados previamente en nuestro laboratorio (philPLA88, philPLA35, philPLA-RODI y philPLA-C1C) pertenecientes a familias diferentes, y un amplio abanico de condiciones dirigidas a la conservación tanto a pequeña como a gran escala (Tablas 4 y 5).

Discusión

En primer lugar, se comparó la estabilidad de los cuatro fagos tras su almacenamiento durante tiempos de entre 12 y 24 meses a diferentes temperaturas (20°C/25°C, 4°C, -20°C, -80°C, -196°C) y utilizando varios agentes crioprotectores (glicerol, disacáridos y leche descremada). De todas las condiciones de almacenamiento en frío estudiadas, los mejores resultados para los cuatro fagos, se obtuvieron a -80°C haciendo uso de leche descremada, disacáridos y glicerol, en este orden, con reducciones del título fágico inferiores a 1 unidad logarítmica. Estos resultados confirman que para mantener la viabilidad de los bacteriófagos en procesos de congelación es necesario añadir ciertos agentes crioprotectores que, junto con la congelación rápida, se sabe que disminuyen la formación y el tamaño de cristales de hielo durante el proceso y, por tanto, la posibilidad de daño estructural. De hecho, la adición de glicerol (50%) y su almacenamiento a -80°C ha demostrado ser una buena estrategia de conservación de suspensiones fágicas durante largos períodos de tiempo (Ackermann et al., 2004).

Se estudió también la opción de almacenar nuestros fagos congelados (-20°C, -80°C y -196°C) en el interior de las células infectadas y en presencia de glicerol al 15%, de forma que los fagos se encontraban protegidos en el citoplasma de la bacteria. En este caso, los mejores resultados se obtuvieron de nuevo a bajas temperaturas (-80°C y -196°C). Sin embargo, nuestros datos presentaron una menor eficacia que los publicados previamente para otros fagos de *S. aureus*, A5W y phiAGO1.3, en los que no se detectó una reducción del título, aunque cabe destacar que los tiempos de almacenamiento del estudio fueron inferiores, 11 y 9 meses, respectivamente (Golec et al., 2011). Además, la existencia de diferencias en las condiciones específicas utilizadas para preparar las células antes de congelarlas podría haber contribuido a la menor viabilidad observada en nuestros fagos. No obstante, los datos obtenidos presentan esta técnica como una opción viable de conservación, sobre todo cuando se utilice como hospedador una bacteria de grado alimentario no patógena y/o para fagos que resulten inestables en cualquiera de las anteriores condiciones.

Tabla 4. Reducción del título fágico de phiPLA35 y phiPLA88 (*Siphoviridae*) tras los procesos de congelación, liofilización y secado.

Fago	Agente Protector	Congelación		Agente Protector	Liofilización*	Agente Protector	Secado por Pulverización**
		(-20°C)*	(-80°C)*				
PhiPLA 35	Trehalosa	p	p	Leche descremada	p	-	-
	Sacarosa	p	p	Sacarosa	p++	-	-
	Glicerol	p	p	Sorbitol	p++	-	-
	Leche descremada	p	p	Células infectadas + leche	p+	-	-
	Células infectadas + glicerol	p+	p+	Células infectadas + sacarosa	p++	-	-
TSB (4°C) Referencia	p+	p+	TSB (4°C) Referencia	p+	-	-	
PhiPLA 88	Trehalosa	p	p	Leche descremada	p	Trehalosa (4°C)	p++
	Sacarosa	p	p	Sacarosa	p	Trehalosa (20°C)	P++
	Glicerol	p	p	Sorbitol	p++	Leche (4°C)	p++
	Leche descremada	p	p	Células infectadas + leche	p	Leche (20°C)	p++
	Células infectadas + glicerol	p+	p+	Células infectadas + sacarosa	p	-	-
TSB (4°C) Referencia	p	p	TSB (4°C) Referencia	p	TSB (4°C) Referencia	p	

NOTA: p (descenso < 1log); p+ (1<log<2) y p++ (descenso >2log). (-) No determinado. Almacenamiento de: (*) 24 meses y (***) 12 meses.

Tabla 5. Reducción del título fágico de phiIPLA-RODI y phiIPLA-C1C (*Myoviridae*) tras los procesos de congelación, liofilización y secado.

Fago	Agente Protector	Congelación			Agente Protector	Liofilización*	Agente Protector	Secado por Pulverización**
		(-20°C)*	(-80°C)*	(-196°C)**				
PhiIPLA-RODI	Trehalosa	p++	p	p	Leche descremada	p+	Trehalosa (4°C)	p++
	Sacarosa	p++	p	p	Sacarosa	P	Trehalosa (20°C)	p++
	Glicerol	p	p	p	Sorbitol	p	Leche (4°C)	p++
	Leche descremada	p++	p	p	Células infectadas + leche	p+	Leche (20°C)	p++
PhiIPLA-C1C	Células infectadas + glicerol	p++	p+	p	Células infectadas + sacarosa	p+		
	TSB (4°C) Referencia	p++	p++	p+	TSB (4°C) Referencia	p++	TSB (4°C) Referencia	P++
	Trehalosa	p++	p	p+	Leche descremada	p++	-	-
	Sacarosa	p++	p	p+	Sacarosa	p++	-	-
	Glicerol	p++	p	p+	Sorbitol	p++	-	-
	Leche descremada	p++	p	p+	Células infectadas + leche	p+	-	-
	Células infectadas + glicerol	p++	p	p+	Células infectadas + sacarosa	p++	-	-
	TSB (4°C) Referencia	p++	p++	p+	TSB (4°C) Referencia	p++	-	-

NOTA: p (descenso < 1log); p+ (1<log<2) y p++ (descenso >2log). (-) No determinado. Almacenamiento de: (*) 24 meses y (**) 12 meses.

Por otro lado, las diferencias en la estabilidad de los fagos entre las dos familias de fagos se hicieron evidentes al aumentar la temperatura de almacenamiento a -20°C . El efecto de esta inactivación fue más pronunciado para los fagos philPLA-RODI y philPLA-C1C, pertenecientes a la familia *Myoviridae*, y de forma más dramática en presencia de trehalosa y sacarosa, en comparación con la leche descremada o el glicerol. Una posible explicación es que el efecto de criopreservación de los disacáridos se pierde durante la congelación lenta (Uchida, Takeya, Nagayama, & Gohara, 2012). Resultados similares ya habían sido observados en el caso del bacteriófago MS2 que mostraba una mayor inactivación en muestras congeladas a -20°C en comparación con la congelación a -80°C (Olson et al., 2004). Lo mismo ocurrió con los lisados de los bacteriófagos, tras 24 meses de almacenamiento a 4°C , los fagos philPLA88 y philPLA35 (fagos de la familia *Siphoviridae*) habían disminuido su título fágico en un rango de menos de 1 unidad logarítmica frente a las 2-3 unidades logarítmicas en el caso de los fagos de la familia *Myoviridae*. Estos descensos del título fágico concuerdan con los descritos previamente en la literatura (Merabishvili et al., 2013), y las diferencias entre familias podrían explicarse por las distintas morfologías que presentan cada una de ellas. Estudios previos indican que los fagos de la familia *Siphoviridae* son más resistentes frente a condiciones adversas que los fagos de la familia *Myoviridae* (Jończyk, Kłak, Międzybrodzki, & Górski, 2011).

A la vista de nuestros resultados podemos concluir que es preciso estudiar previamente las condiciones óptimas para cada bacteriófago y que por tanto, resulta conveniente que los laboratorios utilicen diferentes técnicas en paralelo (por ejemplo, lisados a 4°C y muestras congeladas por duplicado o triplicado a -80°C o -196°C) para la conservación de los bacteriófagos (Ackermann et al., 2004).

En el caso de los procesos destinados a la obtención de formulaciones que permitiesen presentar nuestros fagos en un polvo seco, se evidenció, que tal y como habían demostrado estudios previos, uno de los puntos críticos en estos procesos es la elección del agente crioprotector adecuado (Vandenheuvel et al., 2015; Fortier & Moineau, 2009). De nuevo, la leche descremada proporcionó una buena protección para todos los fagos liofilizados estudiados, tanto durante el proceso de liofilización como en su almacenamiento posterior a 4°C . Estos resultados coinciden con los recogidos en la literatura científica, en los que su uso como agente estabilizador ha demostrado ser eficaz para conservar fagos liofilizados de *S. aureus* entre 12-18 años a -20°C y en vacío (Zierdt, 1988). Los resultados fueron similares cuando se utilizó la sacarosa, salvo en el caso del fago liofilizado philPLA35, que a los 24 meses de almacenamiento sufrió un descenso del título bastante acusado. Una posible razón puede ser la tendencia de los sacáridos a cristalizar en

Discusión

condiciones de humedad elevadas. No obstante, si se controla este parámetro, la sacarosa presenta buenas propiedades como crioprotector, tal y como se ha demostrado cuando se estudió la viabilidad de tres fagos líticos: ECP311 de *E. coli*, KPP235 de *Klebsiella pneumoniae* y ELP140 de *Enterobacter cloacae*, durante 10 meses a una temperatura de 37°C, y además, con la ventaja de que la sacarosa está autorizada como excipiente en la industria farmacéutica (Manohar & Ramesh, 2019). El uso de disacáridos, como la sacarosa y la trehalosa, mostró también resultados interesantes, con pérdidas de 1 unidad logarítmica durante el proceso de liofilización del fago ISP de *S. aureus* y de otra unidad logarítmica más tras su almacenamiento durante 37 meses (Merabishvili et al., 2013).

La liofilización utilizando leche descremada o sacarosa junto con el almacenamiento de células infectadas en lugar del fago libre, resultó ser una estrategia adecuada tras 6 meses de almacenamiento, pero, sobre todo, para aquellos fagos más inestables como es el caso del fago phiPLA-C1C.

Finalmente, se utilizó también el sorbitol como posible agente crioprotector, obteniéndose buenos resultados en el caso de los fagos phiPLA-RODI y phiPLA-C1C (*Myoviridae*), semejantes a los observados con la leche descremada y la sacarosa. En cambio, este compuesto fue menos efectivo para los fagos phiPLA88 y phiPLA35 (*Siphoviridae*). Otros estudios han demostrado también la efectividad de los polialcoholes. Ackerman (2004) observó que algunos fagos liofilizados pertenecientes a la familia *Siphoviridae* y *Podoviridae* mantuvieron su título inicial tras 21 años de almacenamiento a 4°C, utilizando glicerol (50%) como agente crioprotector, certificando que el vacío en los viales resultaba de suma importancia. Manohar & Ramesh (2019) utilizaron manitol y sorbitol (0.5 M) para estudiar el efecto protector durante el proceso de liofilización de tres fagos líticos, siendo el sorbitol, el crioprotector que mostró mayor protección con el fago ELP140 perteneciente a la familia *Myoviridae*, al igual que lo observado en nuestros resultados.

Respecto al secado por pulverización, cabe destacar que, durante los últimos años, se ha utilizado para obtener bacteriófagos en una formulación de polvo respirable para aplicaciones terapéuticas (Malik et al., 2017). A esto hay que añadir que, además, presenta una ventaja para adaptarse a escala industrial, ya que puede incorporarse a una producción en continuo. El uso de temperaturas elevadas durante el proceso hace necesaria la utilización de agentes protectores, como pueden ser la leche descremada o la trehalosa.

Nuestros resultados mostraron que la leche descremada y la trehalosa proporcionaban una protección adecuada durante el secado en el caso de phiPLA88 (*Siphoviridae*), siendo la trehalosa (reducción de 1 log) ligeramente más eficaz que la leche descremada (reducción de ~2 log). En cambio, phiPLA-RODI (*Myoviridae*) resultó ser menos estable en presencia de ambos estabilizadores durante el proceso (descenso en el título de 3-4 log). Reducciones similares han sido observadas tras el secado por pulverización en presencia de trehalosa para el bacteriófago Rómulo de *S. aureus*, también perteneciente a la familia *Myoviridae* (Vandenheuvel et al., 2013). De forma general, los diferentes estudios de fagos sometidos a secado por pulverización han puesto en evidencia que la trehalosa es mejor estabilizador que la lactosa, el dextrano o el manitol, al conseguir que las pérdidas de viabilidad se mantuviesen por debajo de 1,5 unidades logarítmicas tras el proceso de secado (Leung, Parumasivam, et al., 2018; Matinkhoo et al., 2011; Vandenheuvel et al., 2013). Este efecto protector de los carbohidratos, y en especial de la trehalosa, se atribuye a interacciones directas y formación de enlaces de hidrógeno entre el azúcar y la partícula del fago, y a la presencia de un vidrio de trehalosa amorfo estable con una alta temperatura de transición vítrea (Vandenheuvel et al., 2013; Ly et al., 2019).

Posteriormente, el polvo obtenido tras el proceso de secado de ambos fagos mantuvo cierta estabilidad durante los primeros 6 meses, tanto a 4°C como a temperatura ambiente, en presencia de ambos agentes estabilizantes. De hecho, en el caso del fago phiPLA88, la presencia de trehalosa mostró mejores resultados a temperatura ambiente y baja humedad que a 4°C, manteniendo la viabilidad del fago durante 12 meses. De manera que resulta más crítica la humedad que la temperatura como condición de almacenamiento a controlar, algo ya descrito en otros estudios (Manohar & Ramesh, 2019; Vandenheuvel et al., 2014). La presencia de humedad residual disminuye la temperatura de transición vítrea (T_g) de los sacáridos en sus anhidros en forma amorfa, facilitando su cristalización. La trehalosa es un estabilizador más eficiente ya que presenta un menor contenido de humedad residual frente a otros como la lactosa, y se comprobó que los bacteriófagos son más estables cuando se mantiene en ausencia de humedad (0% de humedad relativa) bajo condiciones de refrigeración (4°C), al evitar la cristalización de la trehalosa amorfa y el daño de las partículas fágicas por estos cristales (Vandenheuvel et al., 2014, 2013). De esa manera, diferentes estudios en los que se ha utilizado trehalosa o lactosa, y se han mantenido bajos niveles de humedad relativa, han obtenido pérdidas del título fágico por debajo de una unidad logarítmica, almacenados en condiciones de refrigeración y temperatura ambiente durante meses (Chang et al., 2019; Leung, Parumasivam, et al., 2018; Vandenheuvel et al., 2014).

Discusión

Resulta de suma importancia para la aplicación de estas técnicas, seguir profundizando en todos los factores que afectan al secado de los bacteriófagos. Por ejemplo, se debe reducir el estrés térmico y mecánico al que se somete el bacteriófago durante la pulverización y secado mediante aire caliente, adecuando la temperatura de entrada del aire y el flujo de aire de atomización de la muestra, lo que permite mejorar la viabilidad del bacteriófago durante el proceso de secado (Matinkhoo et al., 2011; Vandenneuvel et al., 2013). Además, es primordial conocer las propiedades ofrecidas por los agentes protectores no solo durante el proceso de secado, sino también durante el almacenamiento posterior y la distribución del producto obtenido (Leung, Parumasivam, et al., 2018).

Finalmente, hay que tener en cuenta que todas las técnicas analizadas tienen un costo adicional que debe evaluarse atendiendo a su aplicación final pero, además, es importante valorar de forma particular cómo se adecúa para cada fago, ya que como hemos observado la sensibilidad de los fagos parece variar según la familia a la que pertenecen.

3 La encapsulación mejora la estabilidad del bacteriófago philPLA-RODI frente a condiciones ambientales hostiles

El uso de técnicas de encapsulación ha dado lugar a diferentes estudios que permiten la aplicación de bacteriófagos en terapia fágica (Malik et al., 2017). Así, diferentes autores han estudiado la encapsulación para la formulación de bacteriófagos previa a su administración oral. Esta tecnología ha sido principalmente explorada para proteger a los fagos del ambiente ácido que se encuentra en el tracto gastrointestinal cuando estos fagos se usan en el tratamiento de infecciones humanas o animales. Por ejemplo, el fago Felix O1 que infecta *S. enterica* ser. Typhimurium o el fago ZCEC5 de *E. coli* fueron encapsulados utilizando una mezcla de quitosano-alginato-CaCl₂, lo que mejoraba su estabilidad frente al pH ácido. Además, ambos fagos retuvieron su viabilidad cuando se almacenaron a 4°C durante 6 y 8 semanas, respectivamente, siempre y cuando se mantuviese la humedad de las microcápsulas (Ma et al., 2008; Abdelsattar, Abdelrahman, Dawoud, Connerton, & El-Shibiny, 2019). Otros ejemplos de aplicación en terapia fágica han sido la encapsulación en liposomas de un cóctel de fagos *S. enterica* ser. Typhimurium, que los protegieron frente a los ácidos gástricos de las aves (Colom et al., 2015) o, en el caso del fago virulento de *K. pneumoniae*, que demostró una mayor eficacia para el tratamiento de la neumonía en ratones cuando se les administraron fagos encapsulados en lugar de libres (Singla et al., 2016).

Aparte del ámbito clínico, parece interesante también desarrollar las técnicas actuales en microencapsulación o nanoencapsulación para ampliar el uso y aplicación de los bacteriófagos como bioconservantes de alimentos. Cui y colaboradores (2017) evidenciaron la eficacia de un fago encapsulado en liposomas embebidos en una película de quitosano como antimicrobiano contra *E. coli* O157: H7 cuando se aplicó sobre carne de res. No obstante, existen pocos ejemplos publicados sobre la encapsulación de fagos en vesículas y su aplicación en la bioconservación de productos alimenticios.

Teniendo en cuenta el objetivo general de esta Tesis Doctoral y con vistas a favorecer y ampliar el uso de fagos como agentes antimicrobianos, consideramos importante evaluar la estabilidad del fago philPLA-RODI en diferentes condiciones de encapsulación compatibles con el uso del mismo en los alimentos, durante el almacenamiento y en condiciones extremas. Previamente se realizó un estudio preliminar, para analizar la viabilidad de los cuatro fagos tras aplicar un proceso de encapsulación con alginato de calcio. Nuestros resultados mostraron que los 4 fagos microencapsulados eran viables tras 2 meses a temperatura ambiente (20/25°C). De hecho, philPLA-RODI presentó

Discusión

los mejores resultados de estabilidad a temperatura ambiente y a 4°C en cápsulas de alginato de mayor tamaño. Estos resultados eran acordes con los mostrados por otros estudios (Ma et al., 2012).

Basándose en los mejores resultados preliminares obtenidos con el fago phiPLA-RODI, se decidió estudiar la eficiencia de encapsulación del fago y su viabilidad en tres clases de vesículas: liposomas, niosomas y transferosomas. Es importante señalar que anterior a esta Tesis no se habían realizado estudios de encapsulación de bacteriófagos en niosomas y transferosomas. Los mejores resultados en cuanto a viabilidad durante el almacenamiento a 4°C y el efecto protector frente a pH y temperatura, se obtuvieron con los niosomas. De hecho, además de ofrecer una mayor protección a las partículas de fago, presentan un menor coste y mayor estabilidad, debido principalmente a que no contienen fosfolípidos en su estructura (Marianecchi et al., 2014).

Se formaron tres tipos de cada una de las vesículas, atendiendo a las diferentes concentraciones (3, 5 y 7%) de los componentes estructurales de las mismas: Pronanosome Nio-N™, Pronanosome Lipo-N™ y Phospholipon 90G:Span 60 (1:1), respectivamente. Los resultados mostraron siempre valores de eficiencia de encapsulación elevados, en su mayoría por encima del 95%, sin existir una relación significativa entre el porcentaje de componentes y la eficiencia de encapsulación. La explicación podría ser que a partir de cierta concentración de componentes, en la que la eficiencia de encapsulación es cercana al 100%, ésta deja de tener influencia. No obstante, Singla y colaboradores (2016) observaron que al aumentar la concentración de lípidos (del 1 al 1,5%) en la formulación de los liposomas, aumentaba el porcentaje de eficiencia de encapsulación, con un máximo del 92%. Por el contrario, otros estudios previos en los que se encapsularon bacteriófagos de *S. enterica* ser. Typhimurium, consiguieron porcentajes bastante más bajos, alrededor del 50% (Colom et al., 2015). En lo que respecta al tamaño de la vesícula, tampoco se encontró una relación con la eficiencia de encapsulación, pues a pesar de los diferentes tamaños obtenidos para cada uno de los tipos de vesículas (transferosomas ~ 0,5 µm, liposomas ~ 1,6 µm y niosomas ~ 0,8 µm), se obtuvieron eficiencias de encapsulación similares. No obstante, en un estudio previo, se encontró que la eficiencia de la encapsulación aumentaba con el tamaño de los liposomas, aunque cabe destacar que en ese ejemplo concreto, los liposomas de mayor tamaño apenas llegaban a 0,5 µm, gracias a la aplicación de tecnología microfluídica durante el proceso de encapsulación (Leung, Morales, Britton, Kutter, & Chan, 2018).

Es importante señalar que la pérdida de viabilidad del fago phiPLA-RODI fue inferior a 1,5 unidades logarítmicas durante el proceso de encapsulación en los tres tipos

de vesículas, valores aproximados a los obtenidos por otros autores con liposomas, donde la pérdida se situaba en torno a las 2 unidades logarítmicas (Colom et al., 2015). La introducción de modificaciones en los métodos de preparación de este tipo de vesículas ha permitido mejorar la eficiencia de encapsulación y la viabilidad del bacteriófago. Los métodos de laboratorio tradicionales requieren pasos posteriores al procesamiento, como sonicación o extrusión de membrana, para producir formulaciones de tamaño y distribución apropiadas, que afectan a características cruciales como son el perfil de liberación de carga, la tasa de biodegradación, la biodistribución y la estabilidad de los liposomas a lo largo del tiempo (Cinquerrui, Mancuso, Vladislavjevic, Bakker, & Malik, 2018; Jahn, Vreeland, Devoe, Locascio, & Gaitan, 2007). Así, por ejemplo, aplicando la tecnología microfluídica en la obtención de liposomas se consiguieron descensos en el título fágico que no superaban las 0,3 unidades logarítmicas (Leung, Morales, et al., 2018).

Otro aspecto estudiado ha sido la viabilidad del fago phiPLA-RODI encapsulado durante el almacenamiento a 4°C, obteniéndose los mejores resultados en el caso de los niosomas, seguidos por los liposomas y finalmente los transferosomas. De hecho, para todos los tipos de niosomas se obtuvieron valores de estabilidad similares o incluso mejores, en comparación con la suspensión en tampón SM. Una posible explicación es la mayor estabilidad que ofrecen los niosomas al no estar formados por fosfolípidos como ocurre con los liposomas o transferosomas, ya que los fosfolípidos sufren degradación oxidativa (Marianecci et al., 2014). De hecho, la concentración y el tipo de componentes utilizados para la preparación de los liposomas influyen de manera importante en la estabilidad de los mismos (Anderson & Omri, 2004). En consonancia, las formulaciones del fago phiPLA-RODI en liposomas con bajas concentraciones de compuestos lipídicos (30 mg/ml) presentaron los peores resultados. Si bien, la importante caída del título del fago encapsulado y libre podría ser debida a que los componentes de los liposomas se unan a las proteínas del fago necesarias para el reconocimiento y/o la unión al receptor celular, inhibiendo así su interacción con el hospedador.

Los fagos encapsulados en niosomas mostraron una mayor viabilidad frente a condiciones ácidas, con bajadas en el título inferiores a 2 unidades logarítmicas tras una hora a pH 4,5. En el caso de los liposomas, la caída del título del fago encapsulado fue ligeramente superior, hasta una unidad logarítmica más y en los transferosomas no se detectaron fagos. Este hecho se puede relacionar con lo observado anteriormente para el fago K de *S. aureus*, que interactúa con la bicapa lipídica del liposoma. Esto da como resultado que un gran número de fagos se mantengan unidos al exterior de los liposomas en lugar de quedar atrapados dentro de ellos. Estos fagos permanecen activos y se

Discusión

contabilizan como fagos encapsulados cuando se estima el rendimiento de la encapsulación, pero se inactivan más rápidamente en ambientes ácidos que los fagos encapsulados (Cinquerrui et al., 2018).

Con respecto al posible efecto protector de la encapsulación de fagos frente a la temperatura, éste ya se había evidenciado en cápsulas de alginato para el fago f3αSE de *S. enterica* ser. Enteritidis, triplicando el porcentaje de supervivencia del fago encapsulado frente al no encapsulado tras someterlo a 60°C durante una hora (Soto, Retamales, Palza, & Bastías, 2018). En nuestro caso, únicamente los niosomas presentaron un efecto protector con pérdidas de menos de 3 unidades logarítmicas tras someter las muestras a 60°C durante 90 minutos. De nuevo, podría estar relacionado con la menor estabilidad de las vesículas que contienen fosfolípidos en su composición, como son los liposomas y los transferosomas. Existen estudios que han demostrado cómo afecta la temperatura a la estabilidad de los liposomas. Liu y colaboradores (2015) encontraron que, una vez se superaban los 50°C, la estructura del liposoma se desorganizaba tras 10 minutos de incubación. Los fagos libres en las tres clases de vesículas, como era de esperar, se desactivaron totalmente. De hecho, nuestros resultados ya habían mostrado su inactivación total tras 30 minutos a 60°C en tampón SM (Capítulo 2 de esta Tesis).

Por último, cabe destacar que el bacteriófago philPLA-RODI presentó buena estabilidad en presencia de soluciones con elevada salinidad (4,5 M), al no observarse bajadas significativas del título fágico final. No obstante, sí se observó una desestabilización de las vesículas que daba lugar a la liberación del fago, pues se detectó un aumento del título en la fase libre frente al encapsulado. Esta condición podría utilizarse como parámetro a la hora de diseñar las vesículas, de cara a que se liberen los fagos que llevan en su interior, en condiciones de elevada salinidad. Es fundamental poder controlar la liberación de fagos del interior de las nanovesículas, y ya se ha demostrado que ciertos parámetros externos, como la temperatura o el pH, pueden utilizarse para este fin, siempre que no afecten negativamente a la partícula fágica. Otra posibilidad es la ruptura espontánea en contacto con ciertos componentes de la matriz alimentaria (Malik et al., 2017).

En definitiva, nuestros resultados indican que los niosomas son las vesículas más interesantes para la encapsulación de philPLA-RODI. Las líneas de investigación futuras deberán, por tanto, mejorar y optimizar el proceso de encapsulación de bacteriófagos y encontrar sistemas adecuados donde los fagos se puedan agregar directamente a los productos alimenticios de forma segura, que al mismo tiempo garanticen su estabilidad y eficacia a largo plazo.

4 Incompatibilidad del uso combinado del bacteriófago phiPLA-RODI con algunos desinfectantes a concentraciones habituales en la industria alimentaria

Otra de las posibles aplicaciones de los bacteriófagos, aprovechando sus características antimicrobianas, es su uso en la desinfección de superficies en entornos hospitalarios o de la industria alimentaria, bien solos o en combinación con otros compuestos antimicrobianos utilizados en procedimientos de limpieza y desinfección habituales en ambos sectores. Por tanto, se consideró interesante evaluar la eficacia del fago phiPLA-RODI combinado con cuatro desinfectantes (cloruro de benzalconio, triclosán, clorhexidina y peróxido de hidrógeno) para la eliminación de *S. aureus*, con el fin de identificar posibles interacciones sinérgicas o antagónicas. Estudios previos habían demostrado la eficacia de este fago en la eliminación de bacterias de *S. aureus* tanto en estado planctónico, como formando parte de biopelículas (González et al., 2017; Gutiérrez et al., 2015). El impacto de los distintos agentes de limpieza y desinfección en la eficacia del fago phiPLA-RODI hizo necesario optimizar las condiciones de aplicación combinada del mismo con cada uno de los agentes desinfectantes, evitando su inactivación. En el caso de la clorhexidina, no resultó recomendable su uso de forma combinada con el fago phiPLA-RODI. Por el contrario, su aplicación conjunta en determinadas condiciones con cloruro de benzalconio mostró un efecto antibiofilm potenciado frente a *S. aureus*.

En primer lugar, se determinó la susceptibilidad del fago phiPLA-RODI a cada uno de los desinfectantes. Los resultados obtenidos desaconsejaron el uso combinado de estos desinfectantes, a concentraciones utilizadas habitualmente en la industria alimentaria para la higienización, y el fago phiPLA-RODI, ya que dichos compuestos anulaban la capacidad infectiva de las partículas fágicas. Sin embargo, nos permiten proponer que aquellos biocidas, como el cloruro de benzalconio o el peróxido de hidrógeno, que inactivan totalmente al fago phiPLA-RODI, puedan utilizarse para la inactivación del mismo tras su aplicación como desinfectante y antes de verter estos residuos al exterior. Esto podría ser deseable en determinadas aplicaciones tales como, por ejemplo, en la industria alimentaria, en la que la sensibilidad a los biocidas podría ser beneficiosa en un supuesto uso de los fagos como coadyuvantes tecnológicos (Asociación Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2019). Esta estrategia no es necesariamente universal dado que parece que la efectividad del biocida dependerá del tipo de fago, tal y como han demostrado estudios previos llevados a cabo con fagos que infectan bacterias del ácido láctico (Campagna, Villion, Labrie, Duchaine, & Moineau, 2014; Hayes et al., 2017).

Discusión

Además de las concentraciones de uso habitual, se estudió también la eficacia del fago philPLA-RODI en presencia de bajas concentraciones de los desinfectantes, tomando como referencia la MIC del hospedador frente a cada uno de ellos (cloruro de benzalconio, 1 µg/ml; triclosán 0,25 µg/ml; clorhexidina, 2 µg/ml y peróxido de hidrógeno 0,6 mM). Esto permitiría predecir posibles interacciones entre la acción de ambos tipos de antimicrobianos a dosis subinhibitorias para *S. aureus*, situación que puede darse en la industria alimentaria en zonas donde la concentración del desinfectante ha ido decayendo tras su aplicación. En primer lugar, se estudió la posible inactivación de philPLA-RODI en presencia de dosis bajas de los desinfectantes. En este caso, únicamente el peróxido de hidrógeno (0.6 y 1.25 mM) produjo la inactivación del fago después de 24 h de incubación a 37°C.

Tras comprobar cómo afecta la presencia de dichos desinfectantes a la viabilidad del fago philPLA-RODI, se estudió el efecto combinado (sinergia o antagonismo) del fago y de bajas concentraciones de desinfectantes (inocuas para el fago) en la eliminación de *S. aureus*. Los resultados mostraron que la aplicación de estos tratamientos a células planctónicas de *S. aureus* tenía un efecto aditivo (cloruro de benzalconio) o incluso antagónico (peróxido de hidrógeno, triclosán y clorhexidina), pero no se observó sinergia en ningún caso. Por un lado, se estableció la inactivación parcial del fago por el biocida a las concentraciones probadas como posible causa de antagonismo, por ejemplo, en el caso del peróxido de hidrógeno y el triclosán. Sin embargo, en el caso de la clorhexidina, donde el antagonismo con el fago era muy claro, los resultados sugerían un posible efecto secundario de la clorhexidina sobre el desarrollo del ciclo de infección por philPLA-RODI. Se estudiaron posibles hipótesis que pudieran explicar esta interacción: una mayor frecuencia de aparición de mutantes resistentes a los fagos o una posible disminución en la tasa de adsorción de los mismos cuando las bacterias han sido expuestas previamente a la clorhexidina en concentraciones cercanas a la MIC, pero en ningún caso se pudo establecer una correlación. Lo que se puede extraer de estos resultados es que la clorhexidina, incluso a concentraciones muy bajas, no debe usarse en entornos donde se va a realizar un tratamiento con el fago philPLA-RODI. Sería interesante determinar si esta recomendación debe extenderse también a otros fagos de *Staphylococcus*.

También se estudió la existencia de interacciones cuando se aplicaban ambos tipos de antimicrobianos a biopelículas formadas por *S. aureus* sobre superficies abióticas, pues es bien sabido que las biopelículas muestran una resistencia mucho mayor a los desinfectantes que sus homólogos planctónicos (Gutiérrez et al., 2016). En general, los resultados mostraron que la adición del fago y los desinfectantes no daba lugar a efectos antagónicos, e incluso se mejoraba significativamente el tratamiento en el caso del cloruro

de benzalconio. Cuando se aplicaba solo, este compuesto mostraba una pérdida de eficacia en la eliminación de la biomasa de *S. aureus* a las concentraciones más altas ensayadas (50 y 100 µg/ml). Sin embargo, su combinación con el fago phiPLA-RODI daba lugar a un descenso significativo en la cantidad de biomasa. Existen estudios previos que demuestran la capacidad de este fago para difundir a través de las biopelículas de *S. aureus* y eliminarlas (González et al., 2018). Por otro lado, también se ha evidenciado cómo las células que forman parte de esa estructura tridimensional (biopelícula) presentan adaptaciones fisiológicas en respuesta a las condiciones microambientales a las que están expuestas. Estas adaptaciones responden a la expresión de genes específicos, que pueden conducir a un aumento de la resistencia a los biocidas (Bridier, Briandet, Thomas, & Dubois-Brissonnet, 2011). Por ello, es interesante determinar si su combinación con bacteriófagos puede contrarrestar dichas adaptaciones y favorecer la eliminación de las biopelículas.

Por tanto, se puede concluir de este trabajo la necesidad de evaluar el impacto de los distintos agentes de limpieza y desinfección en la eficacia de un producto antimicrobiano a base de fagos, para su aplicación como desinfectante de superficies en el ámbito de la industria alimentaria o del sector sanitario. Este tipo de estudios son esenciales para optimizar las condiciones de aplicación de un producto que contenga fagos, evitando la inactivación de los mismos. Además, en ciertas condiciones, el producto basado en fagos puede potenciar los efectos antibiofilm de desinfectantes de uso común.

Conclusiones

1. El uso de la metodología de superficie de respuesta facilita la identificación de las variables con mayor influencia en la propagación fágica, que en el caso de philPLA-RODI han sido la temperatura y la concentración inicial bacteriana, permitiendo optimizar su propagación en un hospedador alternativo.
2. La utilización de *S. xylosus* en la propagación del bacteriófago philPLA-RODI elimina el riesgo de introducir una bacteria patógena para obtener un producto más seguro, reduciendo los costes de producción y purificación, y facilita previsiblemente la aprobación para su comercialización.
3. Los bacteriófagos estudiados de la familia *Myoviridae* (philPLA-RODI y philPLA-C1C) son más sensibles a todos los procesos de conservación y formulación ensayados que los pertenecientes a la familia *Siphoviridae* (philPLA35 y philPLA88).
4. La congelación a -80°C en presencia de leche descremada al 11% es una técnica adecuada para la conservación de pequeños volúmenes de los cuatro fagos estudiados (philPLA35, philPLA88, philPLA-RODI y philPLA-C1C), al no presentar descenso del título fágico tras 24 meses de almacenamiento.
5. Las formulaciones sólidas, y especialmente la liofilización en presencia de leche descremada al 11%, son apropiadas para el almacenamiento de los cuatro fagos (philPLA35, philPLA88, philPLA-RODI y philPLA_C1C) a temperaturas de refrigeración o a temperatura ambiente.
6. La encapsulación en vesículas es una alternativa viable para la formulación del fago philPLA-RODI, siendo los niosomas los que presentan mejores características en relación a su estabilidad, efecto protector frente a pHs bajos y temperaturas elevadas, y coste, en comparación con los liposomas o los transferosomas.
7. Es recomendable evaluar previamente el impacto de los agentes de limpieza y desinfección en la eficacia de los bacteriófagos como desinfectantes de superficies, ya que pueden existir efectos antagónicos o no, como en el caso del fago philPLA-RODI.

Referencias bibliográficas

- Abdelkader, H., Alani, A. W. G., & Alany, R. G. (2014). Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): self-assembly, fabrication, characterization, drug delivery applications and limitations. *Drug Delivery*, 21(2), 87–100. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.838077>
- Abdelsattar, A. S., Abdelrahman, F., Dawoud, A., Connerton, I. F., & El-Shibiny, A. (2019). Encapsulation of E. coli phage ZCEC5 in chitosan–alginate beads as a delivery system in phage therapy. *AMB Express*, 9(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0810-9>
- Abedon, S. T. (2011). Lysis from without. *Bacteriophage*, 1(1), 46–49. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.13980>
- Abedon, S. T. (2016). Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI). *Bacteriophage*, 6(3), e1220348. <https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1220348>
- Abedon, S. T., García, P., Mullany, P., & Aminov, R. (2017). Editorial: Phage Therapy: Past, Present and Future. *Frontiers in Microbiology*, 8, 981. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00981>
- Ackermann, H. W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 154(4), 245–251. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00067-6)
- Ackermann, H. W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2), 227–243. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>
- Ackermann, H. W., Tremblay, D., & Moineau, S. (2004). Long-term bacteriophage preservation. *WFCC Newsletter*, 38, 35–40. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/285783875>
- Alfadhel, M., Puapermpoonsiri, U., Ford, S. J., McInnes, F. J., & Van Der Walle, C. F. (2011). Lyophilized inserts for nasal administration harboring bacteriophage selective for *Staphylococcus aureus*: In vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 416(1), 280–287. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2011.07.006>
- Ali, J., Rafiq, Q., & Ratcliffe, E. (2019). A scaled-down model for the translation of bacteriophage culture to manufacturing scale. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(5), 972–984. <https://doi.org/10.1002/bit.26911>
- Ameri, M., & Maa, Y.-F. (2006). Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. *Drying Technology*, 24(6), 763–768. <https://doi.org/10.1080/03602550600685275>

Referencias bibliográficas

- Anderson, M., & Omri, A. (2004). The Effect of Different Lipid Components on the In Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations. *Drug Delivery*, 11(1), 33–39. <https://doi.org/10.1080/10717540490265243>
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., & Costerton, J. W. (2012). Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, 33(26), 5967–5982. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.05.031>
- Aserin, A. (2008). *Multiple Emulsions: Technology and Applications* (A. Aserin, Ed.). <https://doi.org/10.1002/9780470209264>
- Asociación Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN). (2019). *Preguntas y Respuestas sobre Coadyuvante Tecnológicos*. Retrieved from http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Preguntas_coadyuvantes.pdf
- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238-257. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)
- Barylski, J., Enault, F., Dutilh, B. E., Schuller, M. B., Edwards, R. A., Gillis, A., ... Adriaenssens, E. M. (2019). Analysis of Spounaviruses as a Case Study for the Overdue Reclassification of Tailed Phages. *Systematic Biology*. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syz036>
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870–926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- Bennett, N. J., Gagic, D., Sutherland-Smith, A. J., & Rakonjac, J. (2011). Characterization of a Dual-Function Domain That Mediates Membrane Insertion and Excision of Ff Filamentous Bacteriophage. *Journal of Molecular Biology*, 411(5), 972–985. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2011.07.002>
- Bernhardt, T. G., Wang, I.-N., Struck, D. K., & Young, R. (2002). Breaking free: “Protein antibiotics” and phage lysis. *Research in Microbiology*, 153(8), 493–501. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(02\)01330-X](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(02)01330-X)
- Binetti, A. , Quiberoni, A., & Reinheimer, J. . (2002). Phage adsorption to Streptococcus thermophilus. Influence of environmental factors and characterization of cell-receptors. *Food Research International*, 35(1), 73–83. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00121-1)
- Boucher, H. W., & Corey, G. R. (2008). Epidemiology of Methicillin-Resistant

- Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 46(S5), S344–S349. <https://doi.org/10.1086/533590>
- Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 31(4), 230–314. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4865539>
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., & Dubois-Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27(9), 1017–1032. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.626899>
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., & Muniesa, M. (2015). Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid*, 79, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.PLASMID.2015.01.001>
- Bueno, E., García, P., Martínez, B., & Rodríguez, A. (2012). Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 158(1), 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.012>
- Campagna, C., Villion, M., Labrie, S. J., Duchaine, C., & Moineau, S. (2014). Inactivation of dairy bacteriophages by commercial sanitizers and disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.012>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2017). *National Outbreak Reporting System (NORS)*. Retrieved from <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>
- Chang, R. Y. K., Wallin, M., Kutter, E., Morales, S., Britton, W., Li, J., & Chan, H.-K. (2019). Storage stability of inhalable phage powders containing lactose at ambient conditions. *International Journal of Pharmaceutics*, 560, 11–18. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2019.01.050>
- Chatterjee, S. S., & Otto, M. (2013). Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. *Clinical Epidemiology*, 5, 205–217. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S37071>
- Cheung, G. Y. C., Rigby, K., Wang, R., Queck, S. Y., Braughton, K. R., Whitney, A. R., ... Otto, M. (2010). *Staphylococcus epidermidis* Strategies to Avoid Killing by Human Neutrophils. *PLoS Pathogens*, 6(10), e1001133. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001133>
- Choińska-Puliś, A., Mituła, P., Śliwka, P., Łaba, W., & Skaradzińska, A. (2015). Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 212–221. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2015.07.001>
- Cinquerrui, S., Mancuso, F., Vladislavjevic, G. T., Bakker, S. E., & Malik, D. J. (2018).

Referencias bibliográficas

- Nanoencapsulation of bacteriophages in liposomes prepared using microfluidic hydrodynamic flow focusing. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02172>
- Clatworthy, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, 3(9), 541–548. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.24>
- Clokic, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31–45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>
- Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Aríñez-Soriano, J., Cortés, P., MasPOCH, D., & Llagostera, M. (2017). Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Scientific Reports*, 7(1), 41441. <https://doi.org/10.1038/srep41441>
- Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Cortés, P., MasPOCH, D., & Llagostera, M. (2015). Liposome-Encapsulated Bacteriophages for Enhanced Oral Phage Therapy against *Salmonella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4841–4849. <https://doi.org/10.1128/AEM.00812-15>
- Comeau, A. M., Tétart, F., Trojet, S. N., Prère, M.-F., & Krisch, H. M. (2007). Phage-Antibiotic Synergy (PAS): β -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. *PLoS ONE*, 2(8), e799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000799>
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- Cui, H., Yuan, L., & Lin, L. (2017). Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 in beef. *Carbohydrate Polymers*, 177, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.137>
- Dong, Y., & Speer, C. P. (2014). The role of *Staphylococcus epidermidis* in neonatal sepsis: Guarding angel or pathogenic devil? *International Journal of Medical Microbiology*, 304(5–6), 513–520. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2014.04.013>
- Doyle, M. E., Hartmann, F. A., & Lee Wong, A. C. (2012). Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? *Animal Health Research Reviews*, 13(02), 157–180. <https://doi.org/10.1017/S1466252312000187>
- El Haddad, L., Ben Abdallah, N., Plante, P.-L., Dumaresq, J., Katsarava, R., Labrie, S., ... Moineau, S. (2014). Improving the Safety of *Staphylococcus aureus* Polyvalent Phages by Their Production on a *Staphylococcus xylosus* Strain. *PLoS ONE*, 9(7),

- e102600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102600>
- Emami, F., Vatanara, A., Park, E. J., & Na, D. H. (2018). Drying Technologies for the Stability and Bioavailability of Biopharmaceuticals. *Pharmaceutics*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS10030131>
- 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(1), 327–349. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092415>
- Esteban, P. P., Alves, D. R., Enright, M. C., Bean, J. E., Gaudion, A., Jenkins, A. T. A., ... Arnot, T. C. (2014). Enhancement of the antimicrobial properties of bacteriophage-K via stabilization using oil-in-water nano-emulsions. *Biotechnology Progress*, 30(4), 932–944. <https://doi.org/10.1002/btpr.1898>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2013). Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. In *ECDC Eurosurveillance report*. <https://doi.org/10.2900/86011>
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. In *EFSA Journal* (Vol. 17). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., & Herskovits, A. A. (2015). A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 641–650. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3527>
- Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A., & García, P. (2018). Application of Bacteriophages in the Agro-Food Sector: A Long Way Toward Approval. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 296. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00296>
- Fister, S., Robben, C., Witte, A. K., Schoder, D., Wagner, M., & Rossmanith, P. (2016). Influence of Environmental Factors on Phage–Bacteria Interaction and on the Efficacy and Infectivity of Phage P100. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1152. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01152>
- Fluit, A. C. (2012). Livestock-associated Staphylococcus aureus. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(8), 735–744. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2012.03846.X>
- Fortier, L.-C., & Moineau, S. (2009). Phage Production and Maintenance of Stocks, Including Expected Stock Lifetimes. In M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Eds.), *Bacteriophages. Methods and Protocols* (pp. 203–219). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_19
- Fortier, L.-C., & Sekulovic, O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence

Referencias bibliográficas

- of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5), 354–365. <https://doi.org/10.4161/viru.24498>
- Fortier, L. C., & Moineau, S. (2009). Phage production and maintenance of stocks, including expected stock lifetimes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 501. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_19
- Foster, T. J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 948–958. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1289>
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018, May 7). Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>
- Galkin, V. E., Yu, X., Bielnicki, J., Ndjonka, D., Bell, C. E., & Egelman, E. H. (2009). Cleavage of bacteriophage lambda cl repressor involves the RecA C-terminal domain. *Journal of Molecular Biology*, 385(3), 779–787. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.081>
- García, P., Madera, C., Martínez, B., Rodríguez, A., & Suárez, J. E. (2009). Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. *Journal of Dairy Science*, 92(7), 3019–3026. <https://doi.org/10.3168/JDS.2008-1744>
- García, P., Martínez, B., Obeso, J. M., & Rodríguez, A. (2008, December 1). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 47, pp. 479–485. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02458.x>
- García, P., Madera, C., Martínez, B., & Rodríguez, A. (2007). Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *International Dairy Journal*, 17(10), 1232–1239. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2007.03.014>
- García, R., Latz, S., Romero, J., Higuera, G., García, K., & Bastías, R. (2019). Bacteriophage Production Models: An Overview. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01187>
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Llaca-Díaz, J. M., & Rodríguez-Noriega, E. (2010). Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiology and Infection*, 138(05), 645. <https://doi.org/10.1017/S0950268809991361>
- Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretrø, T., ... Nychas, G.-J. (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and

- control by alternative novel methods. *Meat Science*, 97(3), 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.023>
- Gill, J., & Hyman, P. (2010). Phage Choice, Isolation, and Preparation for Phage Therapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 2–14. <https://doi.org/10.2174/138920110790725311>
- Golec, P., Dąbrowski, K., Hejnowicz, M. S., Gozdek, A., Łoś, J. M., Węgrzyn, G., ... Łoś, M. (2011). A reliable method for storage of tailed phages. *Journal of Microbiological Methods*, 84(3), 486–489. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2011.01.007>
- González, S., Fernández, L., Campelo, A. B., Gutiérrez, D., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2017). The behavior of *Staphylococcus aureus* dual-species biofilms treated with bacteriophage phiPLA-RODI depends on the accompanying microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.02821-16>
- González, S., Fernández, L., Gutiérrez, D., Campelo, A. B., Rodríguez, A., & García, P. (2018). Analysis of Different Parameters Affecting Diffusion, Propagation and Survival of Staphylophages in Bacterial Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2348. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02348>
- Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., ... Segre, J. A. (2009). Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5931), 1190. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1171700>
- Grieco, S.-H. H., Wong, A. Y. K., Dunbar, W. S., MacGillivray, R. T. A., & Curtis, S. B. (2012). Optimization of fermentation parameters in phage production using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(10), 1515–1522. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1148-3>
- Grit, M., & Crommelin, D. J. A. (1993). Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64(1–3), 3–18. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90053-6](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90053-6)
- Gutiérrez, D., Delgado, S., Vázquez-Sánchez, D., Martínez, B., Cabo, M. L., Rodríguez, A., ... García, P. (2012). Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), 8547–8554. <https://doi.org/10.1128/AEM.02045-12>
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2016). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 7:825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00825>

Referencias bibliográficas

- Gutiérrez, D., Vandenheuvel, D., Martínez, B., Rodríguez, A., Lavigne, R., & García, P. (2015). Two Phages, philPLA-RODI and philPLA-C1C, Lyse Mono- and Dual-Species Staphylococcal Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(10), 3336–3348. <https://doi.org/10.1128/AEM.03560-14>
- Hadas, H., Einav, M., Fishov, I., & Zaritsky, A. (1997). Bacteriophage T4 Development Depends on the Physiology of its Host Escherichia Coli. *Microbiology*, 143(1), 179–185. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-1-179>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., ... Balcão, V. M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*, 212–213, 38–58. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2018.04.007>
- Hayes, S., Murphy, J., Mahony, J., Lugli, G. A., Ventura, M., Noben, J.-P., ... Van Sinderen, D. (2017). Biocidal Inactivation of Lactococcus lactis Bacteriophages: Efficacy and Targets of Commonly Used Sanitizers. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 107. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00107>
- Hernández, A., Ruiz, F. M., Romero, A., & Martínez, J. L. (2011). The Binding of Triclosan to SmeT, the Repressor of the Multidrug Efflux Pump SmeDEF, Induces Antibiotic Resistance in Stenotrophomonas maltophilia. *PLoS Pathogens*, 7(6), e1002103. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002103>
- Hischebeth, G., Randau, T., Ploeger, M., Friedrich, M., Kaup, E., Jacobs, C., ... Wimmer, M. (2019). Staphylococcus aureus versus Staphylococcus epidermidis in periprosthetic joint infection—Outcome analysis of methicillin-resistant versus methicillin-susceptible strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 93(2), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.012>
- Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205–229. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2009). *Practical Methods for Determining Phage Growth Parameters*. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_18
- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., ... Mizunoe, Y. (2010). Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, 465(7296), 346–349. <https://doi.org/10.1038/nature09074>

- Jahn, A., Vreeland, W. N., Devoe, D. L., Locascio, L. E., & Gaitan, M. (2007). Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size. *Langmuir*, 23(11), 6289–6293. <https://doi.org/10.1021/la070051a>
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages-review. *Folia Microbiologica*, Vol. 56, pp. 191–200. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>
- Kasman, L. M., Kasman, A., Westwater, C., Dolan, J., Schmidt, M. G., & Norris, J. S. (2002). Overcoming the Phage Replication Threshold: a Mathematical Model with Implications for Phage Therapy. *Journal of Virology*, 76(11), 5557–5564. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5557-5564.2002>
- King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J., & Carstens, E. B. (2011). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. (A. M. King, E. Lefkowitz, M. J. Adams, & E. B. Carstens, Eds.). London: Elsevier Science.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3)
- Kumar, G. P., & Rajeshwarrao, P. (2011). Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 1(4), 208–219. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2011.09.002>
- Kutter, E., De Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Gogokhia, L., Kuhl, S., & Abedon, S. T. (2010). Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 69–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20214609>
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00020-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
- Leung, S. Y., Morales, S., Britton, W., Kutter, E., & Chan, H.-K. (2018). Microfluidic-assisted bacteriophage encapsulation into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 545(1–2), 176–182. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2018.04.063>
- Leung, S. Y., Parumasivam, T., Nguyen, A., Gengenbach, T., Carter, E. A., Carrigy, N. B., ... Chan, H.-K. (2018). Effect of storage temperature on the stability of spray dried bacteriophage powders. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127, 213–222. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2018.02.033>
- Liu, Y., Liu, D., Zhu, L., Gan, Q., & Le, X. (2015). Temperature-dependent structure stability

Referencias bibliográficas

- and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome. *Food Research International*, 74, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.024>
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* Infections. *The New England Journal of Medicine*, 339(8), 520–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>
- Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1265–1273. <https://doi.org/10.1172/JCI18535>
- Ly, A., Carrigy, N. B., Wang, H., Harrison, M., Sauvageau, D., Martin, A. R., ... Finlay, W. H. (2019). Atmospheric spray freeze drying of sugar solution with phage D29. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00488>
- Ma, Y., Pacan, J. C., Wang, Q., Sabour, P. M., Huang, X., & Xu, Y. (2012). Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage. *Food Hydrocolloids*, 26(2), 434–440. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.11.017>
- Ma, Y., Pacan, J. C., Wang, Q., Xu, Y., Huang, X., Korenevsky, A., & Sabour, P. M. (2008). Microencapsulation of bacteriophage felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), 4799–4805. <https://doi.org/10.1128/AEM.00246-08>
- Malenovská, H. (2014). The influence of stabilizers and rates of freezing on preserving of structurally different animal viruses during lyophilization and subsequent storage. *Journal of Applied Microbiology*, 117(6), 1810–1819. <https://doi.org/10.1111/jam.12654>
- Malik, D. J., Sokolov, I. J., Vinner, G. K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladislavjevic, G. T., ... Kirpichnikova, A. (2017). Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 100–133. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2017.05.014>
- Maltesen, M. J., & Van De Weert, M. (2008). Drying methods for protein pharmaceuticals. *Drug Discovery Today: Technologies*, 5(2–3), e81–e88. <https://doi.org/10.1016/J.DDTEC.2008.11.001>
- Mandenius, C.-F., & Brundin, A. (2008). Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnology Progress*, 24(6), 1191–1203. <https://doi.org/10.1002/btpr.67>
- Manohar, P., & Ramesh, N. (2019). Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51742-4>

- Marianecchi, C., Di Marzio, L., Rinaldi, F., Celia, C., Paolino, D., Alhaique, F., ... Carafa, M. (2014). Niosomes from 80s to present: The state of the art. *Advances in Colloid and Interface Science*, 205, 187–206. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2013.11.018>
- Matinkhoo, S., Lynch, K. H., Dennis, J. J., Finlay, W. H., & Vehring, R. (2011). Spray-dried respirable powders containing bacteriophages for the treatment of pulmonary infections. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(12), 5197–5205. <https://doi.org/10.1002/jps.22715>
- McCallin, S., Sacher, J. C., Zheng, J., & Chan, B. K. (2019). Current State of Compassionate Phage Therapy. *Viruses*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/v11040343>
- Merabishvili, M., Vervaet, C., Pirnay, J.-P., De Vos, D., Verbeken, G., Mast, J., ... Vaneechoutte, M. (2013). Stability of *Staphylococcus aureus* Phage ISP after Freeze-Drying (Lyophilization). *PLoS ONE*, 8(7), e68797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068797>
- Montanaro, L., Speziale, P., Campoccia, D., Ravaioli, S., Cangini, I., Pietrocola, G., ... Arciola, C. R. (2011). Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiology*, 6(11), 1329–1349. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.117>
- Montgomery, D. C. (2000). *Design and analysis of experiments*. Retrieved from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Py7bDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&ots=X6v_o1MU1c&sig=niSwcyGRWB1RK-NL11EdVi_ilRo&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Moriarty, T. F., Kuehl, R., Coenye, T., Metsemakers, W.-J., Morgenstern, M., Schwarz, E. M., ... Richards, R. G. (2016). Orthopaedic device-related infection: current and future interventions for improved prevention and treatment. *EFORT Open Reviews*, 1(4), 89–99. <https://doi.org/10.1302/2058-5241.1.000037>
- Moye, Z. D., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2018, April 19). Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*, Vol. 10. <https://doi.org/10.3390/v10040205>
- Myers, R. H. . A.-C. (2016). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. Wiley.
- Nabergoj, D., Modic, P., & Podgornik, A. (2018). Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate. *MicrobiologyOpen*, 7(2), e00558. <https://doi.org/10.1002/mbo3.558>
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806–

Referencias bibliográficas

1815. <https://doi.org/10.1016/J.PROFOO.2011.09.265>
- Novick, R. P., Christie, G. E., & Penadés, J. R. (2010). The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 541–551. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2393>
- O’Sullivan, L., Bolton, D., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2019). Bacteriophages in Food Applications: From Foe to Friend. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), 151–172. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121747>
- Obeso, J. M., García, P., Martínez, B., Arroyo-López, F. N., Garrido-Fernández, A., & Rodríguez, A. (2010). Use of logistic regression for prediction of the fate of *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk in the presence of two lytic phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), 6038–6046. <https://doi.org/10.1128/AEM.00613-10>
- Oetjen, G.-W., & Haseley, P. (2004). *Freeze-drying*. Wiley-VCH.
- Olson, M. R., Axler, R. P., & Hicks, R. E. (2004). Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *Journal of Virological Methods*, 122(2), 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.010>
- Oppenheim, A. B., Kobilier, O., Stavans, J., Court, D. L., & Adhya, S. (2005). Switches in Bacteriophage Lambda Development. *Annual Review of Genetics*, 39(1), 409–429. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.113656>
- Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 207–228. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18453278>
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*--the “accidental” pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(8), 555–567. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
- Otto, M. (2014). *Staphylococcus epidermidis* Pathogenesis. In P. D. Fey (Ed.), *Staphylococcus Epidermidis. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 17–31). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-736-5_2
- Pandita, A., & Sharma, P. (2013). Pharmacosomes: An Emerging Novel Vesicular Drug Delivery System for Poorly Soluble Synthetic and Herbal Drugs. *ISRN Pharmaceutics*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/348186>
- Parte, A. C. (2018). LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature (Bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(6), 1825–1829. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002786>
- Payne, R. J. H., & Jansen, V. A. A. (2003). Pharmacokinetic Principles of Bacteriophage

- Therapy. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(4), 315–325.
<https://doi.org/10.2165/00003088-200342040-00002>
- Peton, V., & Le Loir, Y. (2014). Staphylococcus aureus in veterinary medicine. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 602–615. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2013.08.011>
- Pirnay, J.-P., Blasdel, B. G., Bretaudeau, L., Buckling, A., Chanishvili, N., Clark, J. R., ... Van den Eede, G. (2015). Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharmaceutical Research*, 32(7), 2173–2179.
<https://doi.org/10.1007/s11095-014-1617-7>
- Plachouras, D., Kärki, T., Hansen, S., Hopkins, S., Lyytikäinen, O., Moro, M. L., ... Florentin, D. (2018). Antimicrobial use in european acute care hospitals: Results from the second point prevalence survey (PPS) of healthcare-associated infections and antimicrobial use, 2016 to 2017. In *Eurosurveillance* (Vol. 23). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.23.46.1800393>
- Quiberoni, A., & Reinheimer, J. A. (1998). Physicochemical characterization of phage adsorption to *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 cells. *Journal of Applied Microbiology*, 85(4), 762–768. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.00591.x>
- Rajera, R., Nagpal, K., Singh, S. K., & Mishra, D. N. (2011). Niosomes: A Controlled and Novel Drug Delivery System. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34(7), 945–953.
<https://doi.org/10.1248/bpb.34.945>
- Rajnovic, D., Muñoz-Berbel, X., & Mas, J. (2019). Fast phage detection and quantification: An optical density-based approach. *PLoS ONE*, 14(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216292>
- Rhoads, D. D., Wolcott, R. D., Kuskowski, M. A., Wolcott, B. M., Ward, L. S., & Sulakvelidze, A. (2009). Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *Journal of Wound Care*, 18(6).
<https://doi.org/10.12968/jowc.2009.18.6.42801>
- Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Donovan, D. M., Rodríguez, A., & García, P. (2013, November). Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: Potential new enzybiotics. *Critical Reviews in Microbiology*, Vol. 39, pp. 427–434.
<https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.723675>
- Ross, T., & McMeekin, T. A. (1994). Predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3–4), 241–264. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90155-4)
- Rupp, M. E. (2014). Clinical Characteristics of Infections in Humans Due to Staphylococcus epidermidis. In P. D. Fey (Ed.), *Staphylococcus Epidermidis. Methods in Molecular*

Referencias bibliográficas

- Biology (Methods and Protocols)* (pp. 1–16). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-736-5_1
- Sabaté Brescó, M., Harris, L. G., Thompson, K., Stanic, B., Morgenstern, M., O'Mahony, L., ... Moriarty, T. F. (2017). Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in Staphylococcus epidermidis Device-Related Infection. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1401. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01401>
- Sampimon, O. C., Lam, T. J. G. M., Mevius, D. J., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2011). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Veterinary Microbiology*, 150(1–2), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.01.017>
- Santos, S. B., Carvalho, C., Azeredo, J., & Ferreira, E. C. (2014). Population Dynamics of a Salmonella Lytic Phage and Its Host: Implications of the Host Bacterial Growth Rate in Modelling. *PLoS ONE*, 9(7), e102507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102507>
- Santos, S., Fernandes, E., Carvalho, C., Sillankorva, S., Krylov, V., Pleteneva, E. A., ... Azeredo, J. (2010). Selection and characterization of a multivalent Salmonella phage and its production in a nonpathogenic Escherichia coli strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 7338–7342. <https://doi.org/10.1128/AEM.00922-10>
- Sawant, A. A., Gillespie, B. E., & Oliver, S. P. (2009). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococcus species isolated from bovine milk. *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 73–81. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2008.09.006>
- Schäfer, P., Fink, B., Sandow, D., Margull, A., Berger, I., & Frommelt, L. (2008). Prolonged Bacterial Culture to Identify Late Periprosthetic Joint Infection: A Promising Strategy. *Clinical Infectious Diseases*, 47(11), 1403–1409. <https://doi.org/10.1086/592973>
- Schleifer, K.-H., & Bell, J. A. (2009). Genus I. Staphylococcus. In W. (Eds. . Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (second, pp. 392–421). <https://doi.org/10.1007/b92997>
- Schmelcher, M., & Loessner, M. J. (2014). Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage*, 4(1), e28137. <https://doi.org/10.4161/bact.28137>
- Sechaud, L., Cluzel, P.-J., Rousseau, M., Baumgartner, A., & Accolas, J.-P. (1988). Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie*, 70(3), 401–410. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(88\)90214-3](https://doi.org/10.1016/0300-9084(88)90214-3)

- Singh, R., Ray, P., Das, A., & Sharma, M. (2010). Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*(9), 1955–1958. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq257>
- Singla, S., Harjai, K., Raza, K., Wadhwa, S., Katare, O. P., & Chhibber, S. (2016). Phospholipid vesicles encapsulated bacteriophage: A novel approach to enhance phage biodistribution. *Journal of Virological Methods*, *236*, 68–76. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2016.07.002>
- Śliwka, P., Mituła, P., Mituła, A., Skaradziński, G., Choińska-Pulit, A., Niezgoda, N., ... Skaradzińska, A. (2019). Encapsulation of bacteriophage T4 in mannitol-alginate dry microspheres and survival in simulated gastrointestinal conditions. *LWT*, *99*, 238–243. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.09.043>
- Soto, M. J., Retamales, J., Palza, H., & Bastías, R. (2018). Encapsulation of specific *Salmonella Enteritidis* phage f3αSE on alginate-spheres as a method for protection and dosification. *Electronic Journal of Biotechnology*, *31*, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.11.006>
- Stefani, S., & Varaldo, P. E. (2003). Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *9*(12), 1179–1186. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2003.00698.X>
- Stewart, P. S., & William Costerton, J. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, *358*(9276), 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)
- Tokman, J. I., Kent, D. J., Wiedmann, M., & Denes, T. (2016). Temperature significantly affects the plaquing and adsorption efficiencies of *Listeria* phages. *Frontiers in Microbiology*, *7*(MAY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00631>
- Touitou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B., & Eliaz, M. (2000). Ethosomes - Novel vesicular carriers for enhanced delivery: Characterization and skin penetration properties. *Journal of Controlled Release*, *65*(3), 403–418. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00222-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00222-9)
- Uchegbu, I. F., & Vyas, S. P. (1998). Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *172*(1–2), 33–70. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00169-0)
- Uchida, T., Takeya, S., Nagayama, M., & Gohara, K. (2012). Freezing Properties of Disaccharide Solutions: Inhibition of Hexagonal Ice Crystal Growth and Formation of Cubic Ice. In E. Borisenko & N. Kolesnikov (Eds.), *Crystallization and material science of modern artificial and natural crystals* (pp. 203–224). Retrieved from

Referencias bibliográficas

- http://www.issp.ac.ru/ebooks/books/open/Crystallization_and_Materials_Science_of_Modern_Artificial_and_Natural_Crystals.pdf
- Vandamme, E. J., & Mortelmans, K. (2019). A century of bacteriophage research and applications: impacts on biotechnology, health, ecology and the economy! *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(2), 323–342. <https://doi.org/10.1002/jctb.5810>
- Vandenbergh, M. F., & Verbrugh, H. A. (1999). Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 133(6), 525–534. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(99\)90181-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2143(99)90181-6)
- Vandenneuvel, D., Lavigne, R., & Brüssow, H. (2015). Bacteriophage Therapy: Advances in Formulation Strategies and Human Clinical Trials. *Annual Review of Virology*, 2(1), 599–618. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-054915>
- Vandenneuvel, D., Meeus, J., Lavigne, R., & Van den Mooter, G. (2014). Instability of bacteriophages in spray-dried trehalose powders is caused by crystallization of the matrix. *International Journal of Pharmaceutics*, 472(1–2), 202–205. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2014.06.026>
- Vandenneuvel, D., Singh, A., Vandersteegen, K., Klumpp, J., Lavigne, R., & Van den Mooter, G. (2013). Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(3), 578–582. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2012.12.022>
- Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., & Diez-Gonzalez, F. (2011). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde. *Food Microbiology*, 28(1), 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.09.009>
- Wang, Q., & Sabour, P. M. (2010). Encapsulation and Controlled Release of Bacteriophages for Food Animal Production. In *Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens* (pp. 237–255). <https://doi.org/10.1128/9781555816629.ch12>
- Warner, C. M., Barker, N., Lee, S.-W., & Perkins, E. J. (2014). M13 bacteriophage production for large-scale applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(10), 2067–2072. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1184-7>
- Watanabe, K., Shirabe, M., Fukuzaki, T., Kakita, Y., Nakashima, Y., & Miake, F. (1993). Electron microscope studies on the host cell energy requirement for injection of PL-1 phage DNA into *Lactobacillus casei*. *Current Microbiology*, 26(5), 293–298.

- <https://doi.org/10.1007/BF01575920>
- Weisser, M., Schoenfelder, S. M. K., Orasch, C., Arber, C., Gratwohl, A., Frei, R., ... Ziebuhr, W. (2010). Hypervariability of Biofilm Formation and Oxacillin Resistance in a *Staphylococcus epidermidis* Strain Causing Persistent Severe Infection in an Immunocompromised Patient. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(7), 2407–2412. <https://doi.org/10.1128/JCM.00492-10>
- Whiting, R. C. (1995). Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *35*(6), 464–494. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8777014>
- Wielders, C., Vriens, M., Brisse, S., de Graaf-Miltenburg, L., Troelstra, A., Fleer, A., ... Fluit, A. (2001). Evidence for in-vivo transfer of *mecA* DNA between strains of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, *357*(9269), 1674–1675. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04832-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04832-7)
- Willey, J. M., Sherwood, L., Woolverton, C. J., & Prescott, L. M. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's microbiology*. Retrieved from https://archive.org/details/Microbiology_7_edition_by_Joanne_Willey_Linda_Sherwood_Chris_Woolverton/page/n151
- Wittebole, X., De Roock, S., & Opal, S. M. (2014). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, *5*(1), 226–235. <https://doi.org/10.4161/viru.25991>
- Wojtyczka, R., Orlewska, K., Kępa, M., Idzik, D., Dziedzic, A., Mularz, T., ... Wąsik, T. J. (2014). Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* Strains from a Hospital Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *11*(5), 4619–4633. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504619>
- World Medical Association. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki. In *JAMA* (Vol. 310). <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
- Xia, G., & Wolz, C. (2014). Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, *21*, 593–601. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2013.04.022>
- Zhang, Y.-Q., Ren, S.-X., Li, H.-L., Wang, Y.-X., Fu, G., Yang, J., ... Wen, Y.-M. (2003). Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Molecular Microbiology*, *49*(6), 1577–1593. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03671.x>

Referencias bibliográficas

Zierdt, C. H. (1988). Stabilities of lyophilized *Staphylococcus aureus* typing bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2590. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2974273>

1 Factor de impacto de las publicaciones presentadas

El factor de impacto de cada publicación corresponde con el que figura en el “Journal Citation Report (JCR)” del año de publicación:

1. González-Menéndez, E., Arroyo-López, F.N., Martínez, B., García P., Garrido-Fernández, A. & Rodríguez, A. (2018). Optimizing Propagation of *Staphylococcus aureus* Infecting Bacteriophage vB_SauM-philPLA-RODI on *Staphylococcus xylosus* Using Response Surface Methodology. *Viruses*, 10(4), 153. <https://doi.org/10.3390/v10040153>

Revista Viruses. Factor de Impacto (JCR 2018): 3.811 (Virology, Q2)

2. González-Menéndez, E., Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A., Martínez, B. & García P. (2018). Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products. *PLoS ONE*, 13(10):e0205728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205728>

Revista PLoS ONE. Factor de Impacto (JCR 2018): 2.776 (Multidisciplinary Sciences, Q2)

3. González-Menéndez, E., Fernández, L., Gutiérrez, D., Pando, D., Martínez, B., Rodríguez, A. & García P. (2018). Strategies to Encapsulate the *Staphylococcus aureus* Bacteriophage philPLA-RODI. *Viruses*, 10(9), 495. <https://doi.org/10.3390/v10090495>

Revista Viruses. Factor de Impacto (JCR 2018): 3.811 (Virology, Q2)

4. Agún, S., Fernández, L., González-Menéndez, E., Martínez, B., Rodríguez, A. & García P. (2018). Study of the Interactions Between Bacteriophage philPLA-RODI and Four Chemical Disinfectants for the Elimination of *Staphylococcus aureus* Contamination. *Viruses*, 10(3), 103. <https://doi.org/10.3390/v10030103>

Revista Viruses. Factor de Impacto (JCR 2018): 3.811 (Virology, Q2)

2 Material suplementario del CAPÍTULO 1, Artículo 1

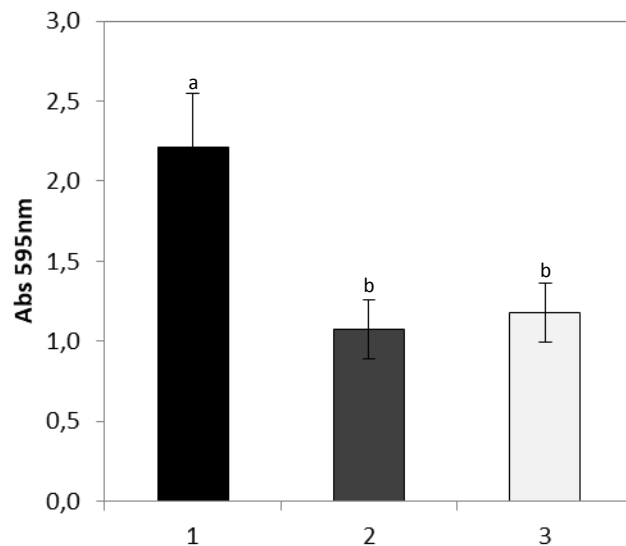


Figure S1. Bacteriophage mediated removal of 24 h-old biofilms of *S. aureus* IPLA16. Biofilms were treated with phage phiIPLA-RODI propagated on *S. aureus* IPLA1 (dark grey) and on *S. xylosus* CTC1642 (light grey). Control biofilms are shown in black. Biomass was calculated by crystal violet staining of adhered cells after phage treatment (test samples) and without phage treatment (control samples). Absorbance was measured at a wavelength of 595 nm. Means and standard deviations were calculated from three biological replicates. Bars having different letters are significantly different (ANOVA; $P < 0.05$).

Table S1. Efficiencies of plaque formation (EOP) of phage phiIPLA-RODI propagated on *S. aureus* IPLA1 (A) and *S. xylosus* CTC1642 (B), on different sensitive strains.

Specie	Strain	Origin	References	EOP ^a	
				A	B
<i>S. aureus</i>	IPLA1 ^b	Dairy industry surfaces	24	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.20
	IPLA15	Meat industry surfaces	24	0.29 ± 0.18	0.31 ± 0.10
	IPLA16	Meat industry surfaces	24	1.33 ± 0.29	0.99 ± 0.4
<i>S. lugdunensis</i>	ZL5-11	Women's breast milk	16	1.02 ± 0.35	1.30 ± 0.20
<i>S. pasteurii</i>	ZL16-6	Women's breast milk	16	0.33 ± 0.05	0.53 ± 0.22
<i>S. arlettae</i>	ZL114-5	Women's breast milk	16	0.37 ± 0.06	0.54 ± 0.06
<i>S. xylosus</i>	ZL61-2	Women's breast milk	16	0.09 ± 0.04	0.10 ± 0.03
<i>S. enterica</i> ser. Gallinarum	ZL90-5	Women's breast milk	16	0.38 ± 0.09	0.27 ± 0.05
<i>S. kloosii</i>	ZL74-2	Women's breast milk	16	0.50 ± 0.18	0.30 ± 0.02

^a Means and standard deviations were calculated from three biological replicates.

^b The reference strain used for the EOP calculations.



FORMULARIO RESUMEN DE TESIS POR COMPENDIO

1.- Datos personales solicitante	
Apellidos: González Menéndez	Nombre: Eva

Curso de inicio de los estudios de doctorado	2016/2017
--	-----------

	SI	NO
Acompaña acreditación por el Director de la Tesis de la aportación significativa del doctorando	X	
Acompaña memoria que incluye		
Introducción justificativa de la unidad temática y objetivos	X	
Copia completa de los trabajos *	X	
Resultados/discusión y conclusiones	X	
Informe con el factor de impacto de la publicaciones	X	

Se acompaña aceptación de todos y cada uno de los coautores a presentar el trabajo como tesis por compendio	X	
Se acompaña renuncia de todos y cada uno de los coautores a presentar el trabajo como parte de otra tesis de compendio	X	

* Ha de constar el nombre y adscripción del autor y de todos los coautores así como la referencia completa de la revista o editorial en la que los trabajos hayan sido publicados o aceptados en cuyo caso se aportará justificante de la aceptación por parte de la revista o editorial

FOR-MAT-VOA-033

Artículos, Capítulos, Trabajos

Trabajo, Artículo 1

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Viruses
27 de marzo de 2018
26 de marzo de 2018
SI
3.811

Coautor2	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor3	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor4	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor5	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor6	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos

Francisco Noé Arroyo-López
Beatriz Martínez
Pilar García
Antonio Garrido-Fernández
Ana Rodríguez

Trabajo, Artículo 2



Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Coautor2 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor4 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor5 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor6 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Coautor2 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor. Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor4 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor5 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor6 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor7 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Coautor1 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor4 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor5 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor6 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

PLoS One
11 de octubre de 2018
01 de octubre de 2018
SI
2.776

Lucía Fernández
Diana Gutiérrez
Beatriz Martínez
Ana Rodríguez
Pilar García

Trabajo, Artículo 3

Viruses
13 de septiembre de 2018
11 de septiembre de 2018
SI
3.811

Lucía Fernández
Diana Gutiérrez
Daniel Pando
Beatriz Martínez
Ana Rodríguez
Pilar García

Trabajo, Artículo 4

Viruses
27 de febrero de 2018
28 de febrero de 2018
SI
3.811

Seila Agún
Lucía Fernández
Beatriz Martínez
Ana Rodríguez
Pilar García



INFORME PARA LA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

Año Académico: 2019 / 2020

1.- Datos personales del autor de la Tesis		
Apellidos: González Menéndez	Nombre: Eva	
DNI/Pasaporte/NIE: 71766208K	Teléfono: 677704348	Correo electrónico: evagome31@hotmail.com

2.- Datos académicos	
Programa de Doctorado cursado: Ingeniería Química, Ambiental y Bioalimentaria	
Órgano responsable: Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente	
Departamento/Instituto en el que presenta la Tesis Doctoral: Tecnología y Biotecnología de Productos Lácteos/Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC	
Título definitivo de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Optimización de procesos para la producción industrial de bacteriófagos	Español/Otro Idioma: Improvement of large-scale bacteriophages production
Rama de conocimiento: Ingeniería y Arquitectura	

3.- Director/es de la Tesis	
D/D ^a : Pilar García Suarez	DNI/Pasaporte/NIE: 32870312T
Departamento/Instituto: Tecnología y Biotecnología de Productos Lácteos/Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC	
D/D ^a : Beatriz Martínez Fernández	DNI/Pasaporte/NIE: 10857845M
Departamento/Instituto/Institución: Tecnología y Biotecnología de Productos Lácteos/Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC	

4.- Informe
<p>La Tesis Doctoral presentada por la doctoranda Eva González Menéndez comprende el estudio de estudio de la producción, formulación y almacenamiento de cuatro bacteriófagos que infectan a las bacterias patógenas <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i>. Todo este trabajo está enfocado a entender los factores que influyen en la producción, la estabilidad y viabilidad de los bacteriófagos en los diferentes procesos, con objeto de mejorar su aplicación como nuevos antimicrobianos y su futura comercialización.</p> <p>El trabajo ha dado lugar a la publicación de cuatro artículos, cada uno de los cuales refleja los diferentes aspectos del estudio. Dado que todos ellos están ya aceptados, consideramos que la presentación de la Tesis en el formato por artículos facilitará una mejor comprensión de cada uno de ellos.</p> <p>Finalmente, como directoras de esta Tesis, queremos hacer constar que la participación de Eva González en cada una de las publicaciones ha sido muy significativa, hecho que queda reflejado en su posición como primer o tercer autor en la totalidad de las citadas publicaciones.</p>

En Villaviciosa, a 15 de junio de 2020

Director/es de la Tesis Doctoral

Firmado por GARCIA SUAREZ MARIA
 PILAR - DNI 32870312T el día 15/06/2020
 con un certificado emitido por AC
 Administración Pública

Fdo.: Pilar García Suárez

MARTINEZ
 FERNANDEZ
 BEATRIZ - DNI
 10857845M

Firmado digitalmente
 por MARTINEZ
 FERNANDEZ BEATRIZ -
 DNI 10857845M
 Fecha: 2020.06.15
 16:13:00 +02'00'

Fdo.:

Beatriz Martínez Fernández

FOR-MAT-VOA-034-2



ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Rodríguez González	Nombre: Ana	
DNI/Pasaporte/NIE 11384659G	Teléfono 985893246	Correo electrónico anarguez@ipla.csic.es

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
<p>Optimizing Propagation of <i>Staphylococcus aureus</i> Infecting Bacteriophage vB_SauM-phiPLA-RODI on <i>Staphylococcus xylosus</i> Using Response Surface Methodology (2018) <i>Viruses Basel</i>, 10: 153</p> <p>Study of the Interactions between Bacteriophage phiPLA-RODI and Four Chemical Disinfectants for the Elimination of <i>Staphylococcus aureus</i> Contamination (2018) <i>Viruses Basel</i>, 10: 103.</p> <p>Strategies to Encapsulate the <i>Staphylococcus aureus</i> Bacteriophage phiPLA-RODI (2018). <i>Viruses Basel</i> (Special Issue "Biotechnological Applications of Phage and Phage-Derived Proteins") 10: 495</p> <p>Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of <i>Staphylococcus</i> phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products (2018) <i>PlosOne</i> 13(10):e0205728</p>

FOR- MAT-VOA-035-2

ACEPTACIÓN:	
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada ____ Optimización de procesos para la producción industrial de bacteriófagos ____	
Y elaborada por D. <u>Eva González Menéndez</u>	
Firma	
	Villaviciosa, 7 de Marzo de 2019

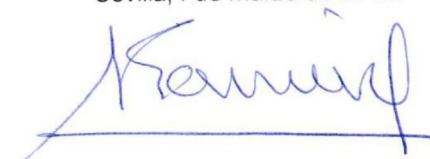


ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Garrido Fernández	Nombre: Antonio	
DNI/Pasaporte/NIE 23600168Y	Teléfono 650680015	Correo electrónico garfer@cica.es

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
<p>- Optimizing Propagation of <i>Staphylococcus aureus</i> Infecting Bacteriophage vB_SauM-philPLA-RODI on <i>Staphylococcus xylosus</i> Using Response Surface Methodology</p>

FOR-MAT-VOA-035-2

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada ___ ___ Optimización de procesos para la producción industrial de bacteriófagos ___
Y elaborada por D. _____ Eva González Menéndez _____
Firma
Sevilla, 4 de marzo de 2019.




ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Martínez Fernández	Nombre: Beatriz	
DNI/Pasaporte/NIE 10857845M	Teléfono 985892233	Correo electrónico bmf1@ipla.csic.es

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
<ul style="list-style-type: none">- Optimizing Propagation of <i>Staphylococcus aureus</i> Infecting Bacteriophage vB_SauM-phiPLA-RODI on <i>Staphylococcus xylosus</i> Using Response Surface Methodology.- Study of the Interactions Between Bacteriophage phiPLA-RODI and Four Chemical Disinfectants for the Elimination of <i>Staphylococcus aureus</i> Contamination.- Strategies to Encapsulate the <i>Staphylococcus aureus</i> Bacteriophage phiPLA-RODI.- Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of <i>Staphylococcus</i> phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products.

FOR- MAT-VOA-035-2

ACEPTACIÓN:	
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada __ ____ Optimización de procesos para la producción industrial de bacteriófagos ____	
Y elaborada por D. _____ Eva González Menéndez _____	
Firma	Villaviciosa, 21 de_Marzo_de 2019.
 Beatriz Martínez	



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Pando Rodríguez	Nombre: Daniel	
DNI/Pasaporte/NIE 09442990H	Teléfono 686010513	Correo electrónico pando@nanovexbiotech.com

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
<ul style="list-style-type: none">- Strategies to Encapsulate the <i>Staphylococcus aureus</i> Bacteriophage phiIPLA-RODI

FOR- MAT-VOA-035-2

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada Optimización de procesos para la producción industrial de bacteriófagos
Y elaborada por D. Eva González Menéndez
Llanera, 15 de diciembre de 2018.
Firma

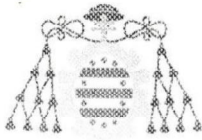


ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Gutiérrez Fernández	Nombre: Diana	
DNI/Pasaporte/NIE 71662108L	Teléfono 680355993	Correo electrónico dianagufer@ipla.csic.es

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
<ul style="list-style-type: none">- Strategies to Encapsulate the <i>Staphylococcus aureus</i> Bacteriophage phiPLA-RODI.- Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of <i>Staphylococcus</i> phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products.


ACEPTACION:	
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada ___ ___ Optimización de procesos para la producción industrial de bacteriófagos ___	
Y elaborada por D. _____ Eva González Menéndez _____	
Firma	Villaviciosa, 4 de Marzo de 2019.
	



ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Arroyo López 26038257A	Nombre: Francisco Noé 954 611 550 ext 142	Correo electrónico fnoe@ig.csic.es

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
<ul style="list-style-type: none">- Optimizing Propagation of <i>Staphylococcus aureus</i> Infecting Bacteriophage vB_SauM-phiIPLA-RODI on <i>Staphylococcus xylosus</i> Using Response Surface Methodology

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada ___ ____ Optimización de procesos para la producción industrial de bacteriófagos ____
Y elaborada por D. _____ Eva González Menéndez _____
Sevilla, 4 de Marzo de 2019.
Firma 

FOR- MAT-VOA-035-2



ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Fernández Llamas	Nombre: Lucía	
DNI/Pasaporte/NIE 71878619P	Teléfono 619098118	Correo electrónico lucia.fernandez@ipla.csic.es

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
<ul style="list-style-type: none">- Study of the Interactions Between Bacteriophage phiPLA-RODI and Four Chemical Disinfectants for the Elimination of <i>Staphylococcus aureus</i> Contamination.- Strategies to Encapsulate the <i>Staphylococcus aureus</i> Bacteriophage phiPLA-RODI.- Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of <i>Staphylococcus</i> phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products.

FOR- MAT-VOA-035-2

ACEPTACIÓN:	
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada ____ Optimización de procesos para la producción industrial de bacteriófagos ____	
Y elaborada por D. _____ Eva González Menéndez _____	
Firma 	Villaviciosa, 1 de marzo de 2019.



ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: García Suárez	Nombre: Pilar	
DNI/Pasaporte/NIE 32870312T	Teléfono 985893420	Correo electrónico pgarcia@ipla.csic.es

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
<ul style="list-style-type: none">- Optimizing Propagation of <i>Staphylococcus aureus</i> Infecting Bacteriophage vB_SauM-philPLA-RODI on <i>Staphylococcus xylosus</i> Using Response Surface Methodology.- Study of the Interactions Between Bacteriophage philPLA-RODI and Four Chemical Disinfectants for the Elimination of <i>Staphylococcus aureus</i> Contamination.- Strategies to Encapsulate the <i>Staphylococcus aureus</i> Bacteriophage philPLA-RODI.- Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of <i>Staphylococcus</i> phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products.

FOR- MAT-VOA-035-2

ACEPTACIÓN:	
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada ___ Optimización de procesos para la producción industrial de bacteriófagos ___	
Y elaborada por D. <u>Eva González Menéndez</u>	
Firma	Villaviciosa, _21_ de marzo de 2019.



**ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO
PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Agún García	Nombre: Sheila	
DNI/Pasaporte/NIE 32891354C	Teléfono 696242443	Correo electrónico: shei_s_s@hotmail.com

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
<ul style="list-style-type: none">- Study of the Interactions Between Bacteriophage phiPLA-RODI and Four Chemical Disinfectants for the Elimination of Staphylococcus aureus Contamination.

FOR- MAT-VOA-035-2

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada <u>Optimización de procesos para la producción industrial de bacteriófagos</u>
Y elaborada por D. Eva González Menéndez
Villaviciosa, 11 de marzo de 2019.
Firma 




RENUNCIA COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Agún García	Nombre: Sheila	
DNI/Pasaporte/NIE 32891354C	Teléfono 696242443	Correo electrónico: shei_s_s@hotmail.com

2.- Tesis Doctoral
Título: Optimización de procesos para la producción industrial de bacteriófagos
Autor: Eva González Menéndez
Programa de doctorado: Programa de Doctorado en Ingeniería Química, Ambiental y Bioalimentaria.

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Study of the Interactions Between Bacteriophage phiPLA-RODI and Four Chemical Disinfectants for the Elimination of Staphylococcus aureus Contamination.

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores sean presentadas como parte de otra tesis doctoral presentada como compendio de publicaciones.
Firma  Villaviciosa, ... 11 de ... marzo ... de 2019.

FOR- MAT-VOA-036-2

