

DZIYANA SHYMIALEVICH, MICHAŁ WÓJCICKI, STANISŁAW BŁAŻEJAK

WYKORZYSTANIE FAGÓW LITYCZNYCH DO OGRANICZANIA LICZBY PAŁECZEK *SALMONELLA* W ROŚLINNEJ MATRYCY ŻYWNOŚCIOWEJ

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań była izolacja bakteriofagów ze ścieków komunalnych oraz określenie skuteczności ich stosowania jako środka eliminacji wybranych serowarów bakterii z rodzaju *Salmonella* z żywności minimalnie przetworzonej. Roślinną matrycę żywnościową stanowiły kiełki rzodkiewki.

Wyizolowano cztery bakteriofagi specyficzne wobec bakterii z rodzaju *Salmonella*. Określono ich aktywność lityczną, morfologię z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) oraz tolerancję na wybrane czynniki środowiskowe (temperaturę oraz pH). Przygotowany koktajl fagowy zaaplikowano przy użyciu metod natrysku oraz wkładki absorpcyjnej do kiełków rzodkiewki wcześniej zainfekowanych bakteriami z rodzaju *Salmonella*. Wszystkie wyizolowane fagi skutecznie skróciły fazę logarymicznego wzrostu badanych szczepów. Bakteriofagi charakteryzowały się złożoną budową. Na podstawie analizy morfologicznej zostały sklasyfikowane do rzędu *Caudovirales*. Wrażliwość fagów na czynniki środowiskowe jest cechą indywidualną, a przy projektowaniu preparatu bakteriofagowego należy dobierać fagi o stabilnych cechach i szerokim zakresie tolerancji na czynniki zewnętrzne. Wykazano, że temperatura silniej oddziaływała na zahamowanie aktywności litycznej badanych fagów aniżeli kwasowość czynnika środowiska. Najwyższą redukcję liczby pałeczek *Salmonella*, na poziomie 99 % w porównaniu z próbkami kontrolnymi, uzyskano po zastosowaniu wkładki absorpcyjnej zawierającej koktajl fagowy.

Przeprowadzone badania potwierdzają skuteczność fagów w zapewnianiu bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności minimalnie przetworzonej. Pomimo braku unijnych przepisów prawnych dotyczących preparatów bazujących na bakteriofagach litycznych, w przyszłości mogą one stać się jedną z biologicznych metod zwiększających bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności o minimalnym stopniu przetworzenia. Będą mogły być również skutecznym środkiem dezynfekującym przeznaczonym do czyszczenia sprzętu produkcyjnego.

Słowa kluczowe: bakteriofagi (fagi), cykl lityczny, *Salmonella*, żywność minimalnie przetworzona, kiełki, utrwalanie żywności

Inż. D. Shymialewich, prof. dr hab. inż. S. Błażej, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Instytut Nauki o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa, inż. D. Shymialewich, mgr inż. M. Wójcicki, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. W. Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa. Kontakt: michal.wojcicki@ibprs.pl

Wprowadzenie

Produkcja żywności minimalnie przetworzonej ogranicza się do zastosowania nowoczesnych, niskoenergetycznych metod utrwalania surowca [19]. Pod pojęciem żywności minimalnie przetworzonej należy rozumieć produkty otrzymane z wykorzystaniem ograniczonej liczby zabiegów technologicznych, które gwarantują bezpieczeństwo mikrobiologiczne, lecz mogą wpływać na cechy sensoryczne [19, 30]. Spośród szerokiej gamy produktów pochodzenia roślinnego o minimalnym stopniu przetworzenia, których dotyczy najwyższe ryzyko zanieczyszczenia mikrobiologicznego, można wymienić kiełki, mieszanki sałat oraz soki niepasteryzowane.

Bakterie z rodzaju *Salmonella* to Gram-ujemne, względnie beztlenowe pałeczki, które nie wytwarzają przetrwalników. Należą do rodziny *Enterobacteriaceae* i są wskaźnikiem jakości mikrobiologicznej żywności [6]. Rodzaj ten obejmuje dwa gatunki: *Salmonella enterica* oraz *Salmonella bongori*. Pierwszy z nich obejmuje sześć podgatunków, których serotypy różnią się między sobą strukturą wiciową i somatyczną. Dotychczas opisano ponad 2600 różnych serotypów *S. enterica* [4, 13]. Głównym źródłem pałeczek *Salmonella* są zwierzęta, w tym drób, świnie i bydło. Bakterie *Salmonella* są jednym z najczęściej izolowanych patogenów przenoszonych przez żywność [4, 11, 13, 24]. Rocznie odnotowuje się 93,8 mln przypadków zachorowań spowodowanych spożyciem zanieczyszczonej żywności, z czego 155 tysięcy kończy się zgonem pacjentów [4]. Do chorób związanych z zakażeniem *S. enterica* zalicza się dur brzuszny wywołany przez *Salmonella* Typhi, zakażenia ogólnoustrojowe (paradury) wywołane przez *Salmonella* Paratyphi oraz zapalenie jelit, zwane salmonellozą, związane z wieloma serotypami (np. *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* czy *S. Agona*) [4, 6]. Serowary duru brzuszego powodują choroby inwazyjne wśród ludzi, natomiast serowary niedurowe wywołują choroby również u zwierząt [32]. Patogenność serowarów *S. enterica* może być specyficzna dla wielu żywicieli (np. *S. Typhimurium*) lub ograniczona do jednego gospodarza (np. *S. Typhi*), a przebieg infekcji wywołany przez ten sam serowar jest zróżnicowany w zależności od gospodarza. Przykładowo serowar *S. Typhimurium* infekuje szeroką gamę żywicieli, zarówno ludzi, jak i zwierząt, a także różne typy komórek gospodarza, w tym makrofagi i komórki niefagocytarne, takie jak enterocyty nabłonka jelitowego [24].

Jedną z metod utrwalania żywności jest wykorzystanie bakteriofagów – wirusów, których cykl replikacyjny odbywa się w komórkach bakteryjnych. Wykorzystanie bakteriofagów jako biologicznej metody eliminacji bakteryjnych patogenów żywności jest stosunkowo nową koncepcją utrwalania żywności. Na świecie dostępny jest szereg komercyjnych preparatów bakteriofagowych przeznaczonych dla przemysłu spożywczego [33]. Wykorzystanie bakteriofagów umożliwia regulację zanieczyszczenia opornymi szczepami bakterii (np. tworzącymi biofilm bakteryjny). Fagi mogą rozwijać się jedynie w komórkach bakteryjnych, zatem nie oddziałują na komórki człowieka. Dzię-

ki szczepowej specyficzności nie niszczą naturalnej mikroflory jelitowej ludzi i zwierząt [10, 22, 33]. W preparatach bakteriofagowych stosowane są jedynie fagi lityczne, co zapobiega nabywaniu przez bakterie oporności oraz horyzontalnemu transferowi genów [18, 33].

Wymagania konsumentów związane z przetwórstwem żywności i dążenie producentów do produkcji mało przetworzonych produktów powodują konieczność poszukiwania przez nich nowych rozwiązań zapewniania jakości. Dąży się do produkcji żywności o minimalnym stopniu przetworzenia, a przy tym w pełni bezpiecznej mikrobiologicznie [19, 30]. Komercyjne preparaty bakteriofagowe nie są zatwierdzone w UE, w tym w Polsce, do stosowania w przemyśle rolno-spożywczym. W ośrodkach naukowych na świecie prowadzi się jednak intensywne badania nad skutecznością ich stosowania [23].

Celem przeprowadzonych badań była izolacja bakteriofagów ze ścieków komunalnych oraz określenie skuteczności ich stosowania jako środka eliminacji wybranych serowarów bakterii z rodzaju *Salmonella* z żywności minimalnie przetworzonej na przykładzie kiełków rzodkiewki.

Material i metody badań

Szczepy pałeczek z rodzaju *Salmonella* pochodziły z Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych – Centrum Zasobów Mikrobiologicznych Zakładu Mikrobiologii IBPRS-PIB. W badaniach użyto czterech serowarów *Salmonella enterica* subsp. *enterica*: *S. Virchow* (KKP 997), *S. Itami* (KKP 1001), *S. Enteritidis* (KKP 3078) oraz *S. Typhimurium* (KKP 3079). Źródło fagów stanowił ściek komunalny pozyskany z Gminnego Przedsiębiorstwa Wodociągów i Kanalizacji „Mokre Łąki” w Izabelinie k. Warszawy. Badania mikrobiologiczne przeprowadzono na dostępnych na polskim rynku kiełkach rzodkiewki.

Poszukiwano specyficznych bakteriofagów wobec wymienionych wyżej serowarów *Salmonella*. Namnażanie i izolację fagów prowadzono metodą płytek dwuwarstwowych [1, 5], następnie łysinki fagowe wycinano za pomocą skalpela i oczyszczano w buforze SM [17]. Kinetykę wzrostu badanych szczepów *Salmonella* infekowanych fagami sprawdzano metodą, którą zaproponowali Islam i wsp. [7] z użyciem automatycznego analizatora wzrostu Bioscreen C (Yo AB Ltd, Growth Curves, Finlandia). Przyjęto współczynnik infekcji MOI = 1,0, a pomiar wykonano w dziesięciu powtórzeniach. Na podstawie krzywych wzrostu bakterii wyznaczono współczynniki właściwej szybkości wzrostu (μ) z równania:

$$\mu = \frac{\ln OD_{max} - \ln OD_{min}}{t}$$

gdzie:

$\ln OD_{\max}$ – logarytm naturalny z wartości maksymalnej gęstości optycznej hodowli podczas wykładniczego wzrostu,

$\ln OD_{\min}$ – logarytm naturalny z wartości minimalnej gęstości optycznej hodowli podczas wykładniczego wzrostu,

t – czas trwania fazy wzrostu wykładniczego hodowli [h].

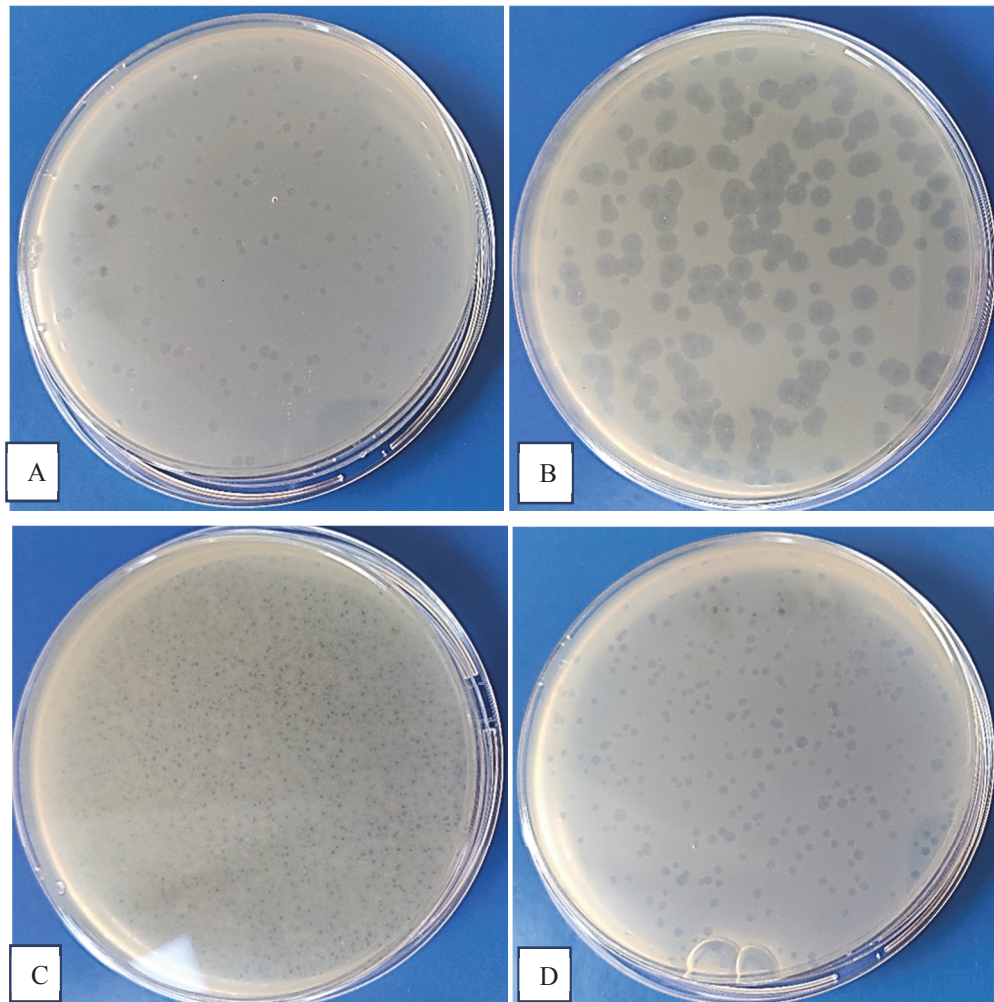
Do określania morfologii wyizolowanych bakteriofagów zastosowano transmisyjny mikroskop elektronowy (JEOL JEM-1220, USA). Preparaty przygotowywano na siateczkach miedziowo-wolframowych napyłanych węglem i wybarwiano 2-procentowym roztworem kwasu fosforowolframowego [26]. Badano wpływ temperatury i pH na zachowanie aktywności litycznej fagów. Zdolność do lizy komórek bakteryjnych gospodarzy po godzinnym termostataowaniu w zmiennych warunkach temperatury i kwasowości czynnej sprawdzano metodą płytek dwuwarstwowych [25], w trzech powtórzeniach.

Przygotowany koktajl fagowy (o mianie $1,9 \cdot 10^8$ PFU·ml⁻¹), zawierający wszystkie cztery wyizolowane bakteriofagi, stosowano do sprawdzenia możliwości zahamowania wzrostu badanych serowarów *Salmonella* w roślinnej matrycy żywnościowej. W tym celu 15 g kiełków rzodkiewki pobranych bezpośrednio z opakowania jednostkowego kontaminowano patogennym szczepem bakterii do poziomu 10^7 jtk·g⁻¹ i do próbek wprowadzano, przy użyciu wkładki absorpcyjnej lub natrysku, mieszaninę fagów. Produkt pakowano w folię ochronną, zgrzewano w atmosferze normalnej (MULTIVAC C200, USA) i przechowywano w temp. 20 °C przez 6 dni. Każdy wariant pakowano w trzy niezależne opakowania. W kolejnych dniach przechowywania (1, 4 i 6) określano liczbę pałeczek *Salmonella* metodą posiewów na podłoża diagnostyczne XLD (BTL, Polska) oraz Hektoena (BTL, Polska).

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono w programie Statistica 13.1. Do oceny aktywności litycznej bakteriofagów przy zastosowaniu zmiennych warunków pH oraz temperatury zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test Tukeya ($p < 0,05$). Wpływ czasu przechowywania i sposobu aplikacji koktajlu fagowego na jakość mikrobiologiczną kiełków określono z zastosowaniem dwuczynnikowej analizy wariancji z interakcją ($p < 0,05$).

Wyniki i dyskusja

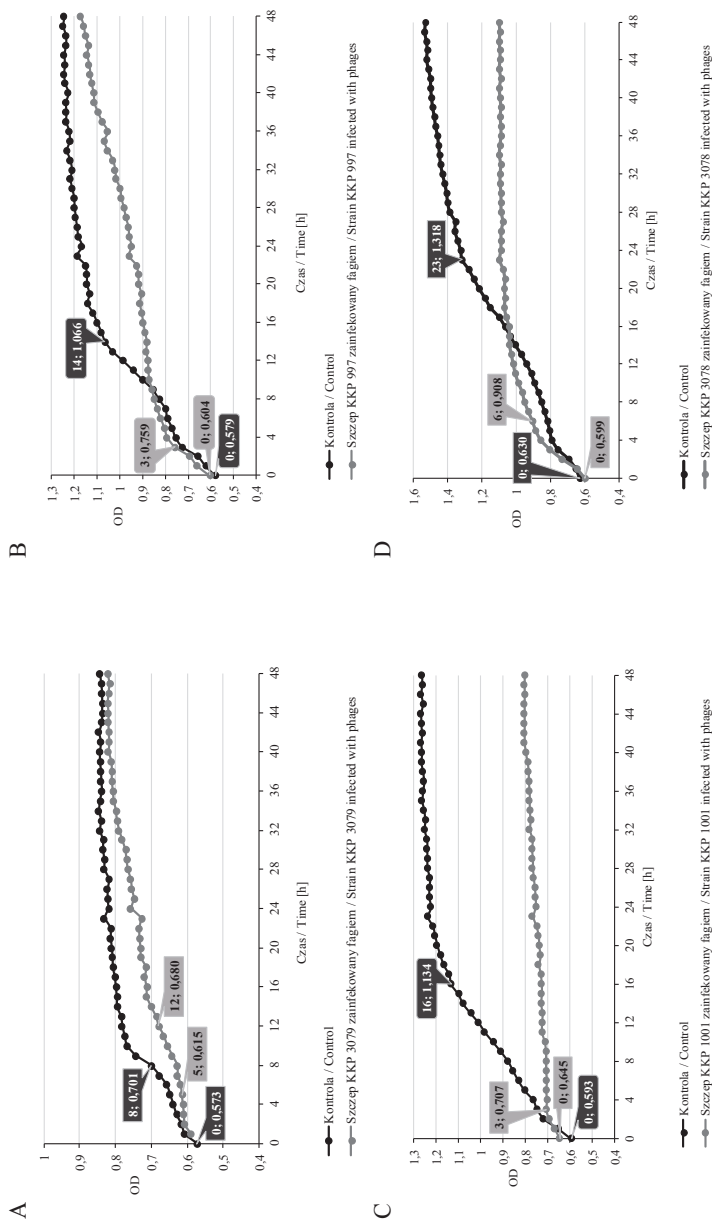
Na fot. 1. przedstawiono łyśinki fagów specyficznych wobec badanych serowarów *Salmonella*. Ich średnica była zróżnicowana, co świadczyło o różnych rozmiarach wyizolowanych fagów. Duża średnica łyśinek wynika z obecności fagów o małych rozmiarach. Dzięki niewielkim rozmiarom cząstek fagi takie łatwiej dyfundują w miękkim agarze i infekują sąsiadujące komórki bakteryjnego gospodarza [20, 36].



Objaśnienia / Explanatory notes:

A – fagi KKP 3266 wobec szczepu KKP 3079 (*S. Typhimurium*) / KKP 3266 phages against KKP 3079 strain (*S. Typhimurium*), B – fagi KKP 3265 wobec szczepu KKP 997 (*S. Virchow*) / KKP 3265 phages against KKP 997 strain (*S. Virchow*), C – fagi KKP 3332 wobec szczepu KKP 1001 (*S. Itami*) / KKP 3332 phages against KKP 1001 strains (*S. Itami*), D – fagi KKP 3267 wobec szczepu KKP 3078 (*S. Enteritidis*) / KKP 3267 phages against KKP 3078 strain (*S. Enteritidis*).

Fot. 1. Łysinki fagów specyficznych wobec badanych szczepów bakterii
Photo 1. Plaques of specific phages against tested bacterial strains



Objaśnienia / Explanatory notes:

Na rysunkach zaznaczono początek i koniec fazy logarytmicznego wzrostu / In figures there are marked the beginning and the end of the logarithmic growth phase; n = 10.

Rys. 1. Krzywe wzrostu badanych serotypów *Salmonella*: A – *S. Typhimurium*, B – *S. Virchow*, C – *S. Itami*, D – *S. Enteritidis*

Fig. 1. Growth curves of *Salmonella* serotypes tested: A – *S. Typhimurium*, B – *S. Virchow*, C – *S. Itami*, D – *S. Enteritidis*

Dla każdego z badanych serowarów wyznaczono kinetykę wzrostu drobnoustrojów zainfekowanych fagami wobec hodowli kontrolnych (rys. 1). W wyniku zainfekowania danego szczepu bakterii specyficznym fagiem dochodziło do stopniowej lizy komórek bakteryjnych, o czym świadczyło zmniejszenie gęstości optycznej hodowli. Na wykresach (rys. 1A - 1D) zaznaczono również początek i koniec fazy logarytmicznego wzrostu. Każdy z zastosowanych fagów specyficznych dla danego szczepu bakteryjnego gospodarza spowodował skrócenie fazy logarytmicznego wzrostu w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Wyznaczone wartości współczynników właściwej szybkości wzrostu (tab. 1) różniły się od graficznego obrazu krzywych wzrostu (rys. 1) z powodu znacznie dłuższego czasu trwania fazy logarytmicznej hodowli kontrolnych w stosunku do hodowli zainfekowanych fagami.

Tabela 1. Współczynniki właściwej szybkości wzrostu (μ) badanych serowarów *Salmonella*
Table 1. Specific growth rate coefficients (μ) of *Salmonella* serovars tested

Serowar <i>Salmonella</i> <i>Salmonella</i> serovar	Hodowla kontrolna Control culture				Hodowla po zainfekowaniu fagiem Culture after phage infection			
	Czas log-fazy Duration of log-phase [h]	OD _{min}	OD _{max}	μ [h ⁻¹]	Czas log-fazy Duration of log-phase [h]	OD _{min}	OD _{max}	μ [h ⁻¹]
		\bar{x}				\bar{x}		
KKP 997	14	0,579	1,066	0,044	3	0,604	0,759	0,076
KKP 1001	16	0,593	1,134	0,041	3	0,645	0,707	0,031
KKP 3078	23	0,630	1,318	0,032	6	0,599	0,908	0,069
KKP 3079	8	0,573	0,701	0,025	7	0,615	0,680	0,014

Objaśnienia / Explanatory notes:

OD_{min} – wartość minimalna gęstości optycznej hodowli / minimal value of optical density of culture;
OD_{max} – wartość maksymalna gęstości optycznej hodowli / maximal value of optical density of culture; \bar{x} – wartość średnia / mean value; n = 10.

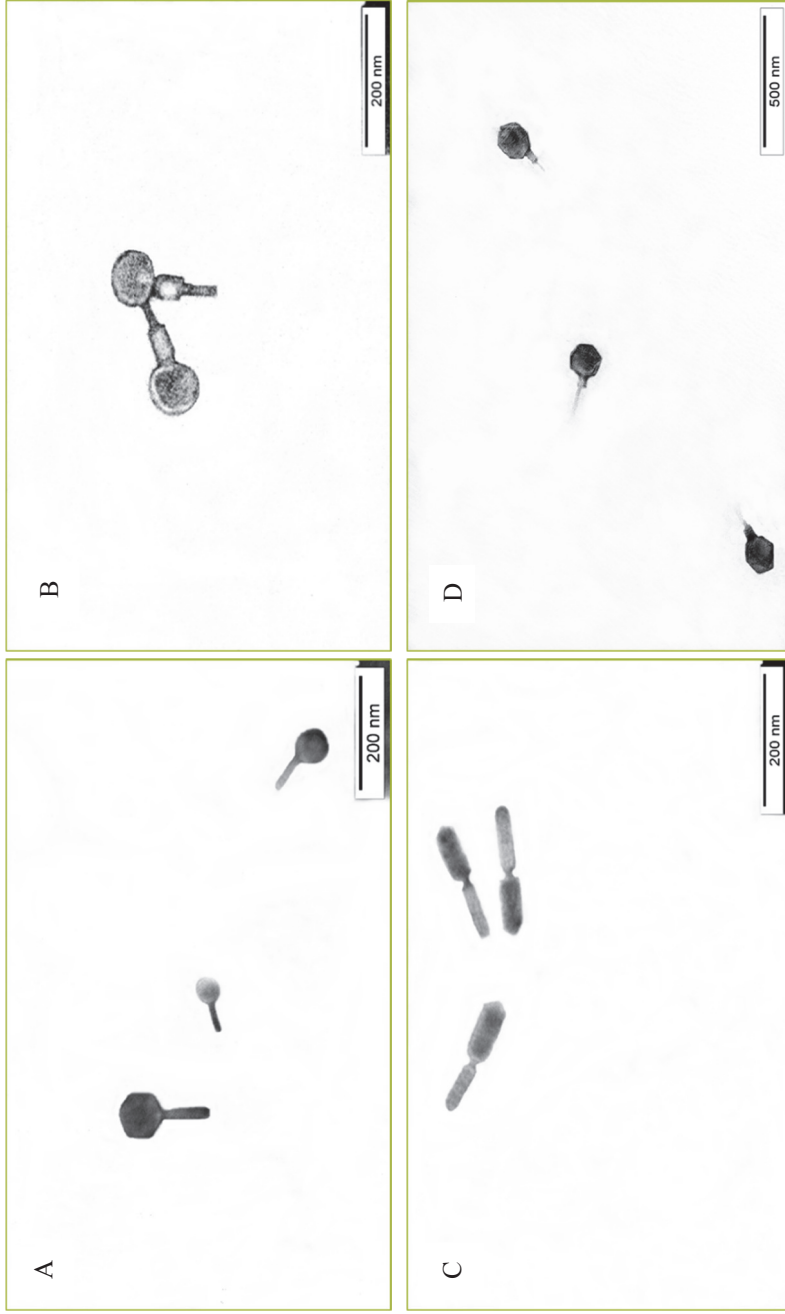
Zmiany szybkości rozpoczęcia fazy logarytmicznego wzrostu w hodowlach zainfekowanych fagami badali Zhao i wsp. [35]. Wykazali, że, niezależnie od zastosowanego współczynnika infekcji, hodowle bakteryjne traktowane fagami istotnie później rozpoczynały log-fazę w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Mahmoud i wsp. [15] odnotowali, że wzrost *Salmonella* Kentucky przy MOI = 1,0 został opóźniony przez wszystkie badane fagi w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Po 24-godzinnej inkubacji fagi całkowicie zahamowały wzrost szczepu bakteryjnego gospodarza. W doświadczeniu Yu i wsp. [34] hodowle infekowane fagami cechowały się słabszym wzrostem w porównaniu z hodowlą kontrolną do 24. godziny. W kolejnej dobie część hodowli przejawiała silniejszy wzrost w porównaniu z hodowlą kontrolną, co autorzy tłumaczyli nabyciem przez bakterie oporności na badane fagi. Opisane doświadczenia

prowadzą do wniosku, że zachowanie aktywności litycznej jest ściśle zależne od rodzaju bakteriofaga, a badanie szybkości lizy komórek bakteryjnych infekowanych fagami w czasie pozwala na wstępne oszacowanie stopnia zjadliwości wirusów.

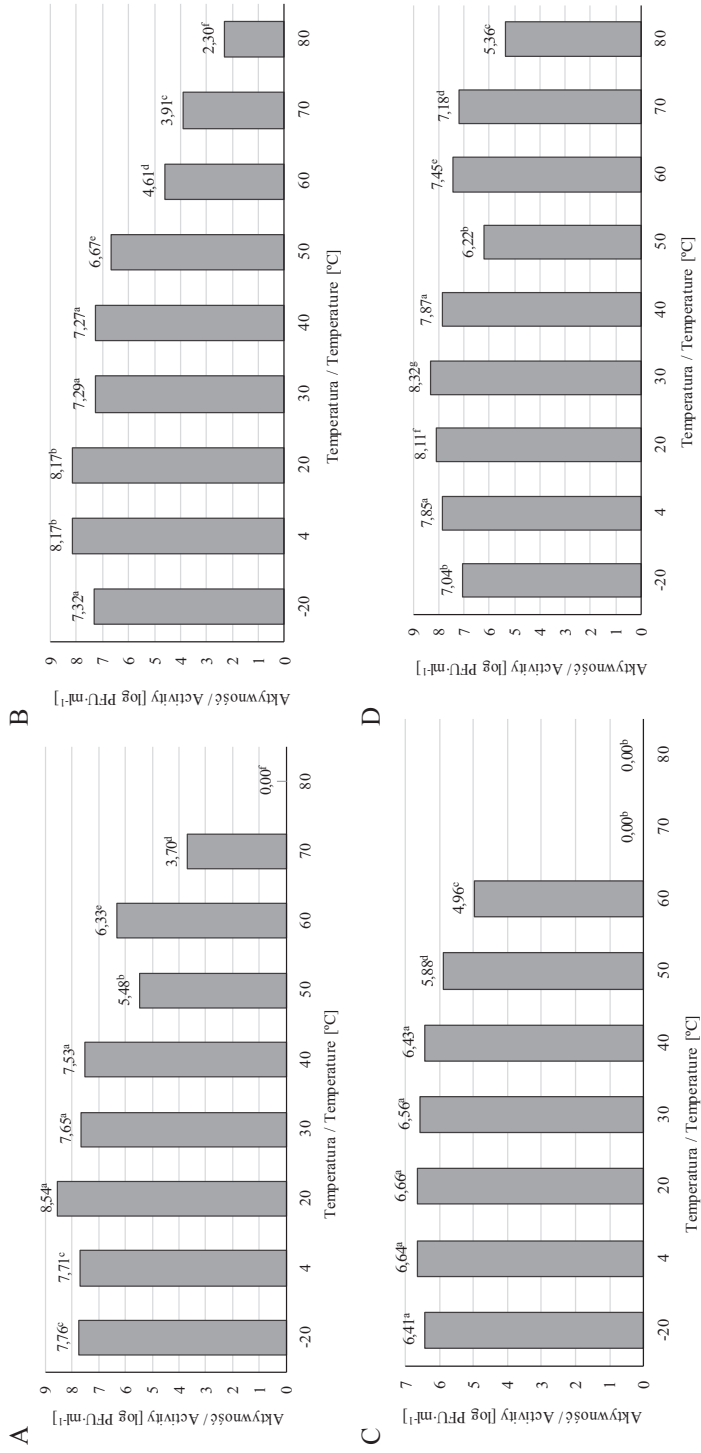
Cechy morfologiczne fagów określono z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) w barwieniu różnicowym (rys. 2). Z uwagi na obecność główki i ogonka wyizolowane wirusy zaklasyfikowano do rzędu *Caudovirales* – bakteriofagów o strukturze złożonej [12]. Większość (ok. 96 %) scharakteryzowanych do tej pory bakteriofagów klasyfikuje się do rzędu *Caudovirales* i większość z nich reprezentuje rodziny *Myoviridae* lub *Siphoviridae* [2].

Na podstawie cech morfologicznych fagi przydzielono do trzech rodzin. Fag KKP 3079, specyficzny dla *S. Typhimurium*, należy do rodziny *Siphoviridae*. Bakteriofagi te charakteryzuje obecność długiego, niekurczliwego ogonka, bez osłonki. Główki fagów, zawierające cały genomowy DNA, miały strukturę dwudziestościenną (ikosaedralną) [12, 15]. Dla *S. Enteritidis* wyizolowano faga KKP 3267 z rodziny *Podoviridae*, którego charakteryzuje krótki i niekurczliwy ogon. Dla bakterii *S. Virchow* oraz *S. Itami* wyizolowano odpowiednio fagi KKP 3265 i KKP 3332 należące do rodziny *Myoviridae*. Bakteriofagi te charakteryzuje obecność długiego, sztywnego i kurczliwego ogonka. Ogonek połączony szyjką z ikosaedralnym kapsydem składa się z wewnętrznej tubularnej rurki rdzeniowej i wyraźnie widocznej zewnętrznej, helikalnej, kurczliwej pochwki [3, 12, 15].

Stopień zachowania aktywności litycznej bakteriofagów określono poprzez podanie ich ekspozycji na szeroki zakres temperatury oraz kwasowości czynnej (pH) środowiska. Na rys. 3. przedstawiono wpływ temperatury w zakresie $-20 \div 80$ °C na zachowanie aktywności litycznej badanych fagów. Termostatowanie fagów w temp. powyżej 50 °C we wszystkich przypadkach spowodowało zmniejszenie aktywności fagów, co mogło mieć związek z denaturacją białek wirionu. W przypadku faga wobec *S. Itami* temp. 70 °C i powyżej całkowicie inaktywowała badanego faga. W przypadku fagów wobec *S. Typhimurium* oraz *S. Enteritidis* w temp. 60 °C wykazano wyższą aktywność lityczną w porównaniu z temp. 50 °C. W przypadku niektórych fagów lizogennych (zdolnych do utajonego cyklu rozwoju) poddanie ich działaniu wyższej temperatury ($42 \div 45$ °C) skutkuje indukcją profagów [14, 21], co przejawia się silniejszą lizą fagów termostatowanych w wyższej temperaturze hodowli. Fagi zachowały najwyższą aktywność w temp. $-20 \div 40$ °C, a podwyższenie temperatury o kolejne 10 °C powodowało redukcję liczby cząstek fagów nawet o 2 rzędy logarytmiczne. Wpływ temperatury na aktywność lityczną fagów został określony w doświadczeniach wielu naukowców. Shahin i Bouzari [25] zaobserwowali, że fagi wobec *Shigella flexneri* zachowały aktywność lityczną w zakresie temp. $4 \div 60$ °C. Temp. 70 °C i wyższa całkowicie zahamowała ich aktywność. W badaniach, które przeprowadzili Thung i wsp.



Rys. 2. Morfologia wyizolowanych bakteriofagów: A – fag KKP 3266, B – fag KKP 3265, C – fag KKP 3332, D – fag KKP 3267
Fig. 2. Morphology of isolated bacteriophages: A – KKP 3266 phage, B – KKP 3265 phage, C – KKP 3332 phage, D – KKP 3267 phage



Objaśnienia / Explanatory notes:

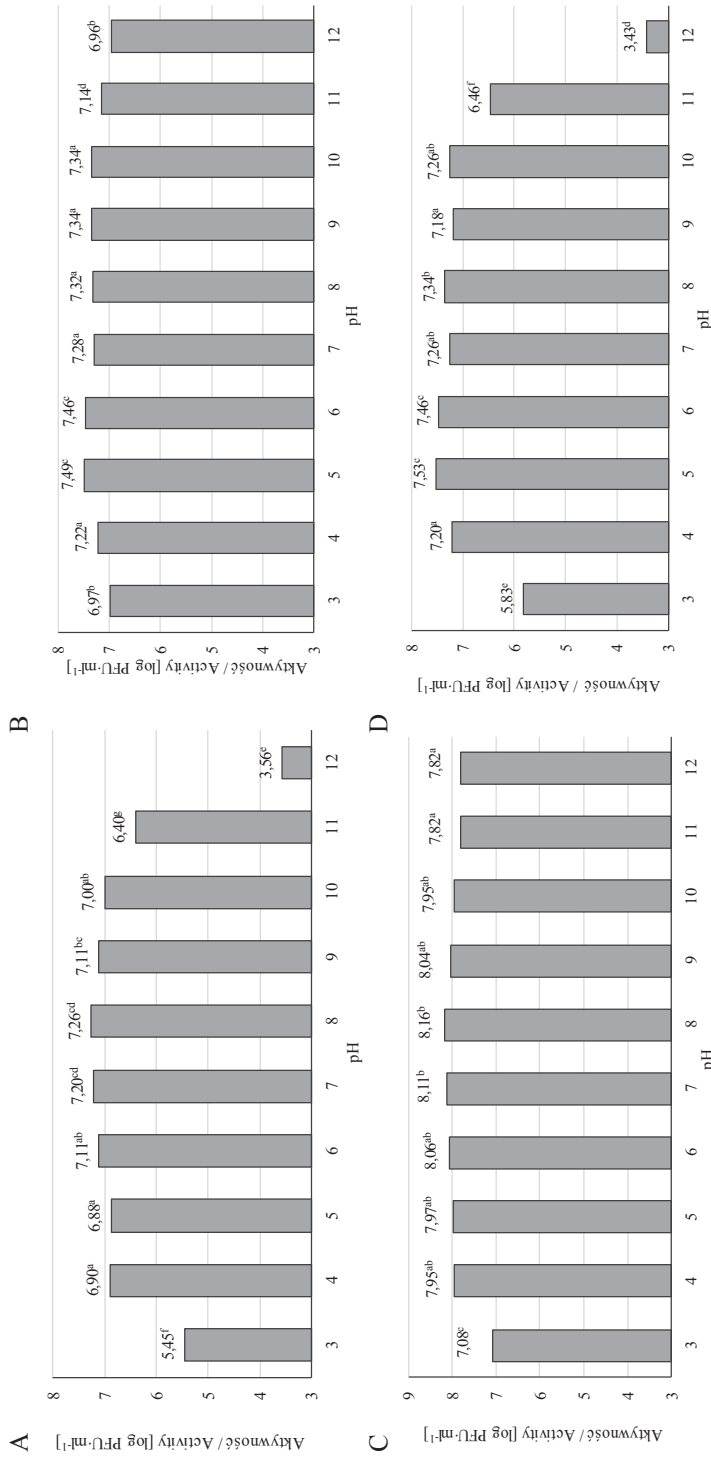
Na rysunku przedstawiono wartości średnie / Figure shows mean values; a, b, ... – wartości średnie oznaczone różnymi literami (na danym wykresie) różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,05$) / mean values denoted by different letters (in the given chart) differ statistically significantly ($p < 0,05$); $n = 3$.
 Rys. 3. Wpływ temperatury na zachowanie aktywności badanych fagów: A – fag KKP 3265, B – fag KKP 3332, C – fag KKP 3267

Fig. 3. Effect of temperature on maintaining activity of phages tested: A – KKP 3265 phage, B – KKP 3332 phage, C – KKP 3267 phage, D – KKP 3267 phage

[29], bakteriofagi przejawiały aktywność wobec *S. Enteritidis* w temp. 65 °C, jednak ich miano uległo zmniejszeniu. Ogólnie uważa się, że w temperaturze niższej od temperatury optymalnej dla aktywności litycznej danego faga mniej materiału genetycznego przenika do komórki bakteryjnego gospodarza. To skutkuje mniejszą liczbą potomnych cząstek wirusa [9]. Jamal i wsp. [8] stwierdzili, że wobec *Pseudomonas aeruginosa* bakteriofagi były stabilne w zakresie temp. 37 ÷ 65 °C, a przy temp. 70 °C były one całkowicie nieskuteczne. Mahmoud i wsp. [15] wykazali z kolei, że fagi były stabilne w zakresie temp. 30 ÷ 70 °C oraz pozostawały aktywne przez 15 min w temp. 80 °C.

Badane fagi sprawdzono pod względem zachowania aktywności litycznej w szerokim zakresie kwasowości czynnej pH 3 ÷ 12 (rys. 4). Kwasowość czynna oddziaływała hamująco na aktywność fagów w mniejszym stopniu niż temperatura. Fagi wobec *S. Virchow* oraz *S. Itami* wykazywały stabilność w całym badanym zakresie pH. W przypadku dwóch pozostałych fagów skrajne wartości pH wpływały istotnie ($p < 0,05$) ograniczając na aktywność lityczną bakteriofagów. Shahin i Bouzari [25] odnotowali, że fagi wobec *S. flexneri* zachowały najwyższą aktywność lityczną w zakresie pH środowiska 7 ÷ 11. Kwasowość czynna poniżej 5 i powyżej 13 całkowicie hamowała ich aktywność. Jamal i wsp. [8] podali, że w ich doświadczeniu fagi przejawiały aktywność przy pH 3 ÷ 11. Z kolei Yu i wsp. [34] podkreślili różnice w zakresie tolerancji na zmienną kwasowość czynną poszczególnych fagów skierowanych wobec tego samego szczepu bakteryjnego gospodarza. Środowisko kwaśne silnie ograniczało aktywność fagów w porównaniu ze środowiskiem alkalicznym. Thung i wsp. [29] badali aktywność fagów wobec *S. Enteritidis* i zaobserwowali całkowitą inaktywację wirusów przy pH 3. Tożsame wyniki przedstawili Sváb i wsp. [27] oraz Thung i wsp. [28]. W innych badaniach [16] fagi zachowały swoją aktywność w zakresie pH 5 ÷ 9 przy inkubacji w temp. 37 °C. Według Wanga i Saboura [31] optymalne pH większości bakteriofagów zawiera się w zakresie 5 ÷ 8. Obniżenie temperatury rozszerza zakres tolerancji pH od 4 do 10 [33]. Zbyt kwaśne środowisko wpływa prawdopodobnie na denaturację białek wirionu, a zdolność do przeżycia w szerokim zakresie pH jest cechą wymaganą w biokontroli [29]. Fagi scharakteryzowane w badaniach własnych utrzymały aktywność zarówno w szerokim zakresie pH, jak i temperatury, co stanowi przesłankę do ich skutecznego zastosowania w biokontroli żywności.

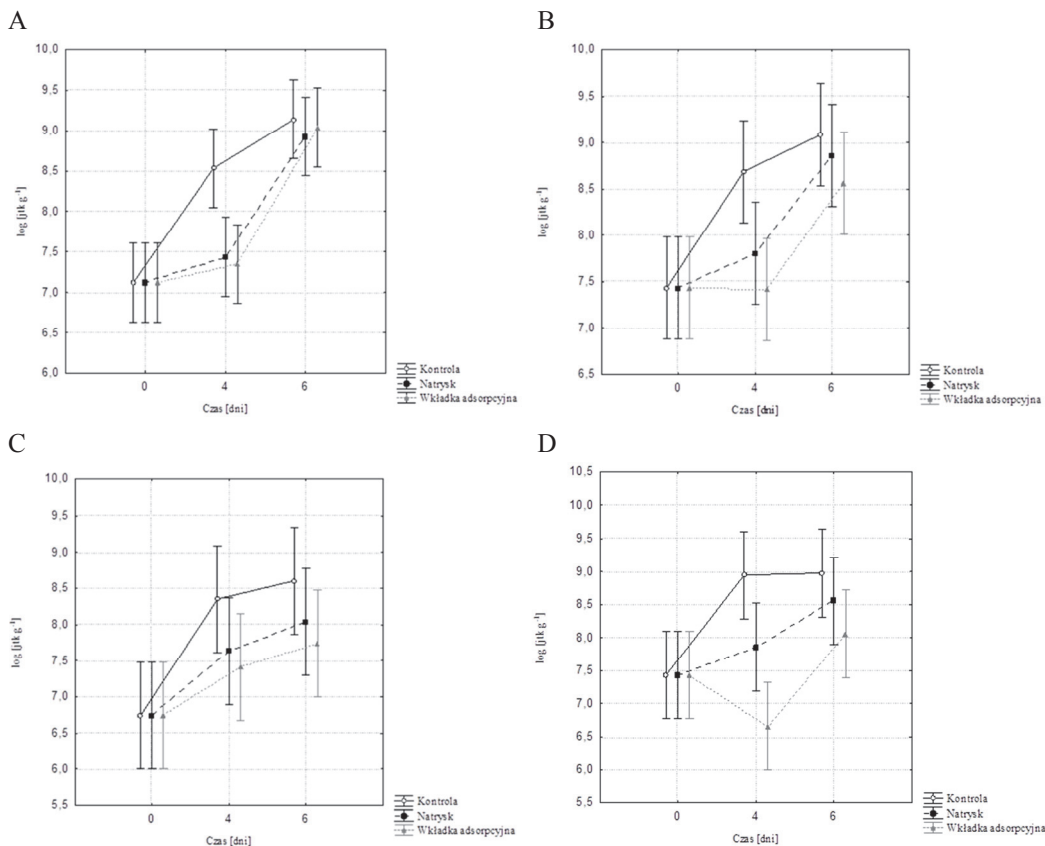
W ostatnim etapie badań oceniono skuteczność zastosowania fagów w roślinnej matrycy żywnościowej, tj. w kielkach rzodkiewki. Wyniki zmiany liczby poszczególnych serowarów *Salmonella* w matrycy żywnościowej przedstawiono na rys. 5. Fagi ograniczyły wzrost pałeczek *Salmonella* wobec prób kontrolnych. We wszystkich przypadkach wkładka absorpcyjna hamowała skuteczniej wzrost pałeczek *Salmonella* w matrycy żywnościowej (redukcja nawet o 2 rzędy logarytmiczne) niż metoda



Objaśnienia jak pod rys. 3. / Explanatory notes as in Fig. 3.

Rys. 4. Wpływ kwasowości czynnej (pH) na zachowanie aktywności badanych fagów: A – fag KKP 3266, B – fag KKP 3265, C – fag KKP 3332, D – fag KKP 3267

Fig. 4. Effect of active acidity (pH) on maintaining activity of phages tested: A – KKP 3266 phage, B – KKP 3265 phage, C – KKP 3332 phage, D – KKP 3267 phage



Objaśnienia / Explanatory notes:

Pionowe słupki na wykresach oznaczają przedziały ufności 0,95 / Vertical bars in the charts represent 0.95 confidence intervals; n = 3.

Rys. 5. Wpływ metody aplikacji fagów oraz czasu przechowywania na liczbę badanych bakterii: A – *S. Typhimurium*, B – *S. Virchow*, C – *S. Itami*, D – *S. Enteritidis*

Fig. 5. Effect of phages application method and storage time on number of bacteria tested: A – *S. Typhimurium*, B – *S. Virchow*, C – *S. Itami*, D – *S. Enteritidis*

natrysku. Prawdopodobnie wkładka absorpcyjna wpływała na zachowanie wyższej aktywności litycznej fagów wchodzących w skład koktajlu. Fagi mogły być podczas przechowywania stopniowo uwalniane z wkładki absorpcyjnej, natomiast w przypadku natrysku dawka mieszaniny fagów była jednorazowa. Wzrost liczby bakterii w kolejnych dniach może świadczyć o nabyciu przez badane pałeczki częściowej oporności na zastosowane fagi. Inną przyczyną wzrostu bakterii mogła być zmiana fizjologii komórek bakterii wywołana stresem środowiskowym, co mogło negatywnie wpłynąć na proces absorpcji fagów [10].

Wnioski

1. Ścieki komunalne charakteryzowały się dużą zawartością wirusów bakteryjnych, co pozwoliło otrzymać preparaty fagowe o wysokim mianie (10^8 PFU·ml⁻¹).
2. Fagi skutecznie skróciły fazę logarytmicznego wzrostu wszystkich badanych serowarów pałeczek *Salmonella*.
3. Wyizolowane fagi charakteryzowały się budową złożoną i prawdopodobnie należały do rzędu *Caudovirale*.
4. Temperatura silniej oddziaływała na zahamowanie aktywności litycznej badanych fagów niż kwasowość czynna. Temperatura powyżej 50 °C zmniejszyła aktywność lityczną fagów wobec wszystkich badanych serowarów pałeczek *Salmonella*. Fagi utrzymały aktywność lityczną niemal w całym zakresie badanego pH (3 ÷ 12).
5. Zastosowanie koktajlu fagowego jako środka do utrwalania roślinnej matrycy żywnościowej zredukowało liczbę pałeczek *Salmonella* nawet o 2 rzędy logarytmiczne (99 %) w porównaniu z próbami kontrolnymi.
6. Przeżywalność fagów w określonych warunkach środowiskowych była cechą indywidualną, dlatego w utrwalaniu żywności minimalnie przetworzonej należy stosować fagi o stabilnych cechach i szerokim zakresie tolerancji na czynniki zewnętrzne.
7. Zastosowanie bakteriofagów litycznych może być jedną z biologicznych metod poprawiających bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności o minimalnym stopniu przetworzenia.

Badania zostały sfinansowane w ramach działalności statutowej IBPRS-PIB nr 144-01 pt. „Wykorzystanie bakteriofagów wobec Salmonella sp. jako innowacyjnej metody zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności”.

Literatura

- [1] Alves D., Cerqueira M.A., Pastrana L.M., Sillankorva S.: Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis. *Food Res. Int.*, 2020, 128, #108791.
- [2] Amarillas L., Lightbourn-Rojas L., Angulo-Gaxiola A.K., Heredia J.B., González-Robles A., León-Félix J.: The antimicrobiological effect of chitosan-based edible coating incorporated with a lytic bacteriophage against *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of tomatoes. *J. Food Safety*, 2018, 36 (6), #e12571.
- [3] Aprea G., D'Angelo A.R., Prencipe V.A., Migliorati G.: Bacteriophage morphological characterization by using Transmission Electron Microscopy. *J. Life Sci.*, 2015, 9, 214-220.
- [4] Dos Santos A.M.P., Ferrari R.G., Conte-Junior C.A.: Virulence factors in *Salmonella* Typhimurium: The sagacity of a bacterium. *Curr. Microbiol.*, 2019, 76, 762-773.

- [5] Echeverría-Vega A., Morales-Vicencio P., Saez-Saavedra C., Gordillo-Fuenzalida F., Araya R.: A rapid and simple protocol for the isolation of bacteriophages from coastal organisms. *MethodsX*, 2019, 6, 2614-2619.
- [6] Eng S.K., Pusparajah P., Mutalib N.S.A., Ser H.L., Chan K.G., Lee L.H.: *Salmonella*: A review on pathogenesis epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Sci.*, 2015, 8 (3), 284-293.
- [7] Islam M.S., Zhou Y., Liang L., Nime I., Yan T., Willias S.P., Mia M.Z., Bei W., Connerton I.F., Fischetti V.A., Li J.: Application of a broad range lytic phage LPST94 for biological control of *Salmonella* in foods. *Microorganisms*, 2020, 8 (2), #247.
- [8] Jamal M., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M.A., Hussain T., Ali M., Das C.R.: Isolation and characterization of a bacteriophage and its utilization against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*-2995. *Life Sci.*, 2017, 190, 21-28.
- [9] Jończyk E., Kłak M., Międzybrodzki R., Górski A.: The influence of external factors on bacteriophages – review. *Folia Microbiol.*, 2011, 56, 191-200.
- [10] Kowalska M., Sokołowska B.: Wykorzystanie bakteriofagów w łańcuchu żywnościowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2016, 4 (107), 26-36.
- [11] Kurtz J.R., Goggins J.A., McLachlan J.B.: *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunol. Lett.*, 2017, 190, 42-50.
- [12] Lefkowitz E.J., Dempsey D.M., Hendrickson R.C., Orton R.J., Siddell S.G., Smith D.B.: Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.*, 2018, 46 (D1), D708-D717.
- [13] Luo Y., Yi W., Yao Y., Zhu N., Qin P.: Characteristic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* from gastroenteritis. *J. Infect. Chemother.*, 2018, 24 (4), 251-255.
- [14] Łoś J.M., Węgrzyn G.: Enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* (EHEC) i bakteriofagi kodujące toksyny Shiga. *Post. Mikrobiol.*, 2011, 50 (3), 175-190.
- [15] Mahmoud M., Askora A., Barakat A.B., Rabie O.E-F., Hassan S.E.: Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt. *Int. J. Food Microbiol.*, 2018, 266, 8-13.
- [16] Międzybrodzki R., Kłak M., Jończyk-Matysiak E., Bubak B., Wójcik A., Kaszowska M., Weber-Dąbrowska B., Łobocka M., Górski A.: Means to facilitate the overcoming of gastric juice barrier by a therapeutic staphylococcal bacteriophage A5/80. *Front. Microbiol.*, 2017, 8, #467.
- [17] Mirzaei M.K., Nilsson A.S.: Isolation of phages for phage therapy: A comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLOS ONE*, 2015, 10(5), #e0127606.
- [18] Moyer Z.D., Woolston J., Sulakvelidze A.: Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*, 2018, 10 (4), #205.
- [19] Nowicka P., Wojdyło A., Oszmiański J.: Zagrożenia powstające w żywności minimalnie przetworzonej i skuteczne metody ich eliminacji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, 2 (93), 5-18.
- [20] Oh H., Seo D.J., Jeon S.B., Park H., Jeong S., Chun H.S., Oh M., Choi C.: Isolation and characterization of *Bacillus cereus* bacteriophages from foods and soil. *Food Environ. Virol.*, 2017, 9, 260-269.
- [21] Pearl S., Gabay C., Kishony R., Oppenheim A., Balaban N.Q.: Nongenetic individuality in the host-phage interaction. *PLoS Biol*, 2008, 6(5), #e120.
- [22] Połaska M., Sokołowska B.: Bacteriophages – a new hope or huge problem in the food industry. *AIMS Microbiol.*, 2019, 5 (4), 324-346.
- [23] Roszko M.L., Sokołowska B., Juszczyk-Kubiak E., Świder O., Wójcicki M.: Bakteriofagi jako czynniki biokontroli *Listeria monocytogenes* w przemyśle spożywczym. W: *Listeria w przemyśle spożywczym*. [on line]. Foodfakty. Dostęp w Internecie [20.04.2021]: <https://foodfakty.pl/listeria-w-przemysle-spozywczym>

- [24] Shaheen A., Tariq A., Shehzad A., Iqbal M., Mirza O., Dmitry A., Maslov D.A., Rahman M.: Transcriptional regulation of drug resistance mechanisms in *Salmonella*: Where we stand and what we need to know. *World J. Microb. Biot.*, 2020, 36, #85.
- [25] Shahin K., Bouzari M.: Bacteriophages application for biocontrolling *Shigella flexneri* in contaminated foods. *J. Food Sci. Technol.*, 2018, 55(2), 550-559.
- [26] Sriitha K.S., Bhat S.G.: Genomics of *Salmonella* phage Φ Stp1: Candidate bacteriophage for biocontrol. *Virus Genes*, 2018, 54, 311-318.
- [27] Sváb D., Falgenhauer L., Rohde M., Szabó J., Chakraborty T., Tóth I.: Identification and characterization of T5-like bacteriophages representing two novel subgroups from food products. *Front. Microbiol.*, 2018, 9, #202.
- [28] Thung T.Y., Lee E., Mahyudin N.A., Anuradha K., Mazlan N., Kuan C.H., Pui C.F., Ghazali F.M., Rashid N.-K.M.A., Rollon W.D., Tan C.W., Radu S.: Evaluation of a lytic bacteriophage for biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in different food matrices. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2019, 105, 211-214.
- [29] Thung T.Y., Premarathne J.M.K.J.K., Chang W.S., Loo Y.Y., Chin Y.Z., Kuan C.H., Tan C.W., Basri D.F., Radzi C.W.J.W.M., Radu S.: Use of lytic bacteriophage to control *Salmonella* Enteritidis in retail food. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2017, 78, 222-225.
- [30] Tirpanalan O., Zunaboovic M., Doming K.J., Kneifel W.: Mini review: Antimicrobial strategies in the production of fresh-cut lettuce products. In: *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Research and Technological Advances*. Ed. A. Méndez-Vilas. Formatex Research Center, Badajoz, Spain, 2011, pp.176-188.
- [31] Wang Q., Sabour P.M.: Encapsulation and controlled release of bacteriophages. In: *Bacteriophages in the Control of Food and Waterborne Pathogens*. Eds. P.M. Sabour, M.M.W. Griffiths. ASM Press, Washington 2010, pp. 237-255.
- [32] Wemyss M.A., Pearson J.S.: Host cell death responses to non-typhoidal *Salmonella* infection. *Front. Immunol.*, 2019, 10, #1758.
- [33] Wójcicki M., Błażejczak S., Gientka I., Brzezicka K.: The concept of using bacteriophages to improve the microbiological quality of minimally-processed foods. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2019, 18 (4), 373-383.
- [34] Yu J.-G., Lim J.-A., Song Y.-R., Heu S., Kim G.H., Koh Y.J., Oh C.-S.: Isolation and characterization of bacteriophages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker disease in kiwifruit. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 26 (2), 385-393.
- [35] Zhao J., He L., Pan L., Liu Y., Yao H., Bao G.: Effect of a lytic bacteriophage on rabbits experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *World Rabbit Sci.*, 2017, 25 (3), 273-279.
- [36] Zheng X.-F., Yang Z., Zhang H., Jin W.-X., Xu C.-W., Gao L., Rao S.-Q., Jiao X.: Isolation of virulent phages infecting dominant mesophilic aerobic bacteria in cucumber pickle fermentation. *Food Microbiology*, 2020, 86, #103330.

USING LYTIC PHAGES TO REDUCE THE NUMBER OF *SALMONELLA* RODS IN PLANT FOOD MATRIX

S u m m a r y

The object of the research study was to isolate bacteriophages from municipal wastewater and to determine the effectiveness of using them as a means to eliminate some selected *Salmonella* serovars from minimally processed food. Radish sprouts were a vegetable food matrix.

Four bacteriophages specific against bacteria of the *Salmonella* genus were isolated. Their lytic activity was determined, as well as morphology using Transmission Electron Microscopy (TEM) and tolerance to selected environmental factors (temperature and pH). A prepared phage cocktail was applied to the radish sprouts previously infected with bacteria of the *Salmonella* genus using a spraying method and an absorbent insert. All the phages isolated effectively shortened the logarithmic growth phase of the strains tested. Those isolated phages were characterised by a complex structure. Based on the morphological analysis, they were classified as a *Caudovirales* order. The sensitivity of phages to environmental factors is an individual feature, and when designing a bacteriophage preparation, there should be selected phages with stable features and a wide range of tolerance to external factors. It was shown that the temperature had a stronger effect on the inhibition of lytic activity of the phages tested than the active acidity of the environment. Compared to the control samples, the highest reduction of *Salmonella* rods, at a level of 99 %, was achieved when using an absorbent pad containing the phage cocktail.

The research study confirms the effectiveness of phages in ensuring the microbiological safety of minimally processed food. Although there are no EU legal rules ref. to lytic bacteriophages-based preparations, in the future they may become one of the biological methods to improve the microbiological safety of minimally processed foods. They can also be an effective disinfectant designed to clean production equipment.

Key words: bacteriophages (phages), lytic cycle, *Salmonella*, minimally processed food, sprouts, preservation of food ☒