

MARZENA KOWALSKA, BARBARA SOKOŁOWSKA

WYKORZYSTANIE BAKTERIOFAGÓW W ŁAŃCUCHU ŻYWNOSCIOWYM

Streszczenie

Bakteriofagi są to wirusy bakteryjne odkryte na początku XX wieku. Niedostateczna wiedza na temat biologii fagów oraz intensywny rozwój antybiotykoterapii sprawiły, że tuż po ich odkryciu zainteresowanie naukowców bakteriofagami zmalało. Obecnie podejmowane są próby rozwiązania problemu bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności poprzez zastosowanie bakteriofagów w całym łańcuchu żywnościowym, w tym do bezpośredniej eliminacji bakterii z powierzchni żywności oraz powierzchni sprzętów mających kontakt z żywnością. Znaczącymi zaletami fagów, przemawiającymi za stosowaniem ich jako środków ochrony żywności, jest zdolność do infekowania wyłącznie specyficznych komórek bakteryjnych, brak wpływu na korozję sprzętów i powierzchni w zakładach przetwarzających żywność oraz brak oddziaływania na właściwości sensoryczne produktów spożywczych. Medycyna weterynaryjna zmagą się z szeroko rozpowszechnionym problemem antybiotykoooporności, stąd badany jest potencjał bakteriofagów jako środków wykorzystywanych do zapobiegania infekcjom bakteryjnym u zwierząt hodowlanych i leczenia ich. W tym celu bakteriofagi aplikowane są w postaci aerozoli lub umieszczane w kapsułkach mających zapewnić im ochronę przed inaktywacją w wyniku działania niskiego pH kwasu żołądkowego. Dotychczas przeprowadzone badania potwierdzają również, że bakteriofagi nie wykazują toksycznego wpływu na organizmy ludzi i zwierząt. Fagi stanowią atrakcyjną alternatywę dla dotychczas stosowanych antybiotyków i środków dezynfekcyjnych. Szerokie spektrum zastosowania fagów w łańcuchu żywnościowym umożliwia znaczącą redukcję liczby zatruc pokarmowych na świecie.

Celem niniejszej pracy było przybliżenie najnowszych danych literaturowych dotyczących zastosowania bakteriofagów na każdym etapie procesu powstawania produktów żywnościowych, zwanego powszechnie „od pola do stołu”, oraz przedstawienie najnowszych badań dotyczących stosowania bakteriofagów do szybkiego i łatwego wykrywania bakteryjnych patogenów znajdujących się w żywności.

Słowa kluczowe: bakteriofagi, patogeny, kapsułkowanie, biosensory

Wprowadzenie

Bakteriofagi to wirusy, których gospodarzami są wyłącznie wegetatywne komórki bakteryjne (nie wykazują zdolności do infekowania przetrwalników) [28]. Antybakteryjny potencjał bakteriofagów znany był już w latach 40. XX wieku, jednak intensywny rozwój antybiotykoterapii oraz niedostateczna wiedza dotycząca mechanizmu infekcji tych wirusów spowodowały marginalizację terapii fagowej [2]. Ograniczeniami ówczesnej fagoterapii były także:

- użycie jednego rodzaju faga do zakażenia wywołanego przez wiele gatunków bakterii,
- pojawienie się bakterii fagoopornych,
- inaktywacja fagów przez niskie pH w żołądku w przypadku aplikacji doustnej,
- niszczenie fagów przez układ odpornościowy człowieka,
- endotoksyny zawarte w mieszkankach bakteriofagów.

Powszechność i duża częstotliwość stosowania antybiotyków spowodowały, że obecnie dużym problemem jest wielolekooporność (MDR – *Multi Drug Resistance*) szczepów bakteryjnych [20]. Ponownie zainteresowano się więc bakteriofagami jako środkami mogącymi zastąpić klasyczne metody leczenia. Do wzrostu zainteresowania fagami przyczynił się również rozwój technik biologii molekularnej, umożliwiający znacznie lepsze poznanie mechanizmów ich infekcji i funkcjonowania. Bakteriofagi mogą być wykorzystywane również w łańcuchu żywnościowym, wpływając na zmniejszenie liczby zatruc wywołanych przez drobnoustroje chorobotwórcze przenoszone przez żywność.

Budowa i mechanizm infekcji bakteriofagami

Bakteriofagi zbudowane są z kwasu nukleinowego (dsDNA, ssDNA, dsRNA, ssRNA) otoczonego białkowym kapsydem. Zapewnia on ochronę przed niekorzystnymi czynnikami środowiskowymi, w tym przed działaniem enzymów niszczących DNA faga [13]. Kapsyd bakteriofagów może mieć kształt helikalny (pałczkowaty), wielościenne (ikosaedry lub sześciiany), sferyczny, wrzecionowaty. Szacuje się, że ponad 96 % bakteriofagów charakteryzuje się strukturą złożoną, na którą składa się główka połączona przez białko łącznikowe z ogonkiem, od którego odchodzą wypustki. Rolą wypustek jest rozpoznawanie receptorów znajdujących się na komórkach gospodarzy. Ogonek może być krótki, długi kurczliwy lub długi niekurczliwy. Bakteriofagi o strukturze złożonej łączą w sobie cechy struktury helikalnej i kosaedralnej [6].

Bakteriofagi są wirusami, które we wstępnym etapie infekcji, zwanym adhezją, przyłączają się do powierzchni komórki bakteryjnej [6, 13]. Kolejny etap obejmuje penetrację materiału genetycznego wirusa do wnętrza komórki, w której następuje transkrypcja i translacja fagowych białek (wirionów potomnych) [13]. Nowo powstałe

cząstki faga są pakowane do białkowych kapsydów, a ich uwolnienie na zewnątrz prowadzi do śmierci komórki bakteryjnej. Taki cykl życiowy faga, który kończy się śmiercią gospodarza, nazywa się cyklem litycznym [22, 24]. Czas trwania całego cyklu, od momentu zainfekowania komórki bakteryjnej do jej lizy, wynosi ok. $1 \div 2$ h [6]. Obok fagów litycznych istnieją również fagi lizogeniczne (łagodne), których materiał genetyczny ma zdolność integracji z materiałem genetycznym gospodarza, a cykl życiowy takich fagów nie musi prowadzić do śmierci komórki [22]. Fag łagodny znajdujący się w komórce w postaci utajonej nazywany jest profagiem. Zintegrowany z chromosomem bakteryjnym profag jest replikowany i przekazywany potomnym komórkom bakteryjnym podczas podziałów [10, 13]. Może on również wejść w cykl lityczny w wyniku działania czynników środowiskowych, takich jak stres czy uszkodzenie DNA gospodarza [19]. W terapiach fagowych niewskazane jest używanie fagów o skłonnościach lizogenicznych ze względu na możliwość wystąpienia zjawiska transdukcji (horyzontalnego transferu genów w populacji bakterii) [10, 24]. W wyniku transdukcji może dochodzić do przeniesienia genów kodujących toksyny, np. toksyny Shiga, toksyny cholery oraz genów kodujących oporność na antybiotyki, pomiędzy szczepami patogennymi i niepatogennymi [13, 19, 24]. Ponadto obecność zintegrowanego profaga może warunkować oporność komórki gospodarza na zakażenie tym samym lub blisko spokrewnionym rodzajem faga [10].

Bezpieczeństwo fagoterapii

Bakteriofagi występują powszechnie w naturalnym środowisku. Prawdopodobnie stanowią najliczniejszą populację w ziemskim ekosystemie – ok. 10^{30} wirionów w biomie [2]. Potwierdzono również obecność bakteriofagów w łańcuchu pokarmowym [2, 20, 22]. Bakteriofagi wyizolowano z żywności świeżej i nieprzetworzonej: z mięsa, świeżych warzyw, owoców i grzybów oraz z żywności przetworzonej: sera, jogurtu, maślanki, groszku, a także z owoców morza [22, 26].

Za bezpieczeństwem stosowania bakteriofagów przemawia wyspecjalizowanie wirusów, które infekują tylko określone grupy bakterii. Dotychczas przeprowadzone badania dowodzą, że doustne podawanie fagów jest nieszkodliwe dla ludzi. Zbadano m.in. wpływ fagów specyficznych dla *Escherichia coli* w modelu mysim i ludzkim. Naukowcy nie zaobserwowali toksycznego wpływu fagów na funkcjonowanie obu tych organizmów [7].

Czynniki wpływające na skuteczność infekcji bakteriofagami

Wykazano, że bakteriofagi są wrażliwe na niskie pH, wysoką temperaturę, zasolenie, ciśnienie osmotyczne oraz rozpuszczalniki organiczne a także na małą wilgotność środowiska [8]. Przy tworzeniu preparatów fagowych należy wziąć pod uwagę środowisko, w jakim rozwijają się gospodarze bakteriofaga oraz jego oporność na wy-

żej wymienione czynniki limitujące. Przykładem zależności zdolności infekcyjnej bakteriofaga od temperatury są fagi zakażające *Listeria monocytogenes*. Aby dokonać adhezji muszą one rozpoznać receptor znajdujący się na wici. Fagi te wykazują słabą zdolność infekcji w temp. 37 °C, gdyż ekspresja genów odpowiadających za ruchliwość wici w tej temperaturze jest hamowana [9]. Według Wang i Saboura [28] optymalne pH dla większości bakteriofagów zawiera się w zakresie 5 ÷ 8, natomiast obniżenie temperatury zwiększa zakres tolerancji pH do 4 ÷ 9 [28].

Równie ważnym czynnikiem wpływającym na skuteczność infekcji bakterii przez bakteriofaga jest fizjologia komórki gospodarza. Składniki ścian komórkowych bakterii, takie jak kwasy teichojowe (WTA – *Wall Teichoic Acids*) oraz grupy acetylowe peptydoglikanu są receptorami rozpoznawanymi przez większość bakteriofagów [9]. Zmiany w składzie oraz w strukturze WTA lub peptydoglikanu mogą skutkować zmniejszeniem podatności bakterii na infekcje fagami.

Drobnoustroje znajdujące się w żywności oraz na powierzchniach mających kontakt z żywnością są poddawane wielu stresom związanym z działaniem czynników antybakteryjnych. Powszechnie wiadomo, że stres wpływa na zmianę fizjologii komórek bakterii, co pośrednio wpływa na wydajność adsorpcji fagów. Stres wywołany niedoborem składników odżywczych może również negatywnie wpływać na proces adhezji fagów. Zjawisko to można łatwo zaobserwować w przypadku fagów infekujących komórki *E. coli*, które rozpoznają receptor TolC (białkowy transporter kolicyny) na powierzchni komórki gospodarza. Najwyższy stopień adhezji uzyskany będzie w środowisku bogatym w składniki odżywcze, gdyż poziom ekspresji genów kodujących TolC jest wówczas największy [9].

Potencjalne wykorzystanie bakteriofagów do biokontroli patogenów w środowisku naturalnym

Biokontrola to metoda polegająca na wprowadzeniu do środowiska specyficznych organizmów w celu zahamowania rozwoju populacji, które są szkodnikami upraw [13]. Naukowcy wyizolowali fagi z takich części roślin, jak: liście, łodygi, korzenie i nasiona. Według Gilla i Abedona [11] bakteriofagi znajdujące się w warstwie gleby bezpośrednio przylegającej do korzeni roślin, zwanej ryzosferą, charakteryzują się znacznie większą przeżywalnością niż fagi izolowane ze środowiska fyllosfery, czyli nadziemnych części roślin. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest znacznie większe narażenie fagów na stropy środowiskowe, takie jak wahania temperatury, wysychanie i promieniowanie UV w przypadku fyllosfery. Wymienieni autorzy sugerują równocześnie, że wykorzystanie fagów jako metody biokontroli znacznie gorzej sprawdzi się w przypadku aplikacji do ryzosfery ze względu na utrudnioną dyfuzję przez wysokoheterogenne środowisko, jakim jest gleba. Stosowanie fagów w otwartym środowisku, jakim są np. pola uprawne, stanowi wciąż wyzwanie dla naukowców ze względu na

brak możliwości całkowitej kontroli warunków środowiskowych, duże zróżnicowanie populacji bakteryjnych patogenów roślin oraz ograniczanie aktywności bakteriofagów przez substancje chemiczne będące pozostałościami po pestycydach [4].

Biokontrola patogenów w świeżych owocach i warzywach

Drobnoustroje (wirusy, bakterie, grzyby) atakujące rośliny uprawne powodują ogromne straty w rolnictwie. Dotychczasowe metody zwalczania fitopatogenów roślin uprawnych polegały na użyciu antybiotyków oraz chemicznych środków na bazie miedzi. Ze względu na szybkie tempo pojawiania się bakterii opornych na stosowane środki bakteriobójcze, prowadzone są badania nad wykorzystaniem koktajli fagowych do zapobiegania oraz zwalczania chorób roślin pochodzenia bakteryjnego. Balogh i wsp. [3, 4] badali efektywność koktajli fagowych w zwalczaniu popularnych w rolnictwie fitopatogenów z rodzaju *Xanthomonas*, w zróżnicowanych warunkach środowiskowych. Koktajle fagowe okazały się skuteczne m.in. w zwalczaniu raka bakteryjnego roślin cytrusowych wywoływanego przez *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* [4]. W doświadczeniach prowadzonych w szklarni, w której istnieje możliwość kontrolowania warunków, redukcja nasilenia choroby grejpfrutów odmiany 'Duncan' przy zastosowaniu mieszanki fagów wynosiła 59 %. W warunkach polowych użycie mieszanki bakteriofagów do umiarkowanie wrażliwych pomarańczy odmiany 'Valencia' skutkowało redukcją nasilenia choroby o ok. 48 %, lecz było nieefektywne w przypadku bardzo wrażliwych na ten rodzaj fitopatogenu grejpfrutów odmiany 'Duncan' [4]. Z uwagi na trudności stosowania fagów na otwartej przestrzeni oraz ich stosunkowo krótki czas przeżywalności na tkance roślinnej, Balogh i wsp. [3, 5] poszukiwali formuły ochronnej, która zwiększyłaby aktywność fagów oraz ich odporność na niekorzystne warunki środowiskowe. Pozytywne wyniki uzyskali po zawieszeniu fagów w 0,75-procentowym odtłuszczonym mleku oraz w mieszaninie preżelatynizowanej mąki kukurydzianej i sacharozy. Obie formuły znacząco wydłużały okres zachowywania aktywności fagów na tkance roślinnej, powodując jednocześnie zmniejszenie liczby zmian chorobowych (bakteryjnej plamistości pomidora) wywołanych przez *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Badacze wskazywali również na istotność doboru pory dnia podczas aplikacji bakteriofagów. Uznali, że najlepszym okresem jest wczesny ranek lub późny wieczór ze względu na ograniczenie promieni UV negatywnie wpływających na aktywność fagów [3, 4]. Leverenz i wsp. [16] dowodzą, że niezwykle ważny jest dobór bakteriofaga do danego gatunku owoców. Naukowcy przeprowadzili eksperyment, w którym na świeżo cięte melony i jabłka zaaplikowali mieszankę bakteriofagów specyficznych w stosunku do *Salmonella* spp. Przy przechowywaniu próbek melona w temp. 5 i 10 °C uzyskano redukcję bakterii o 3,5 log, a w temp. 20 °C – o 2,5 log. Na jabłkach redukcja bakterii była natomiast nieznaczna. Zdaniem wymienionych autorów prawdopodobną przyczyną niskiej aktywności mieszanki fagów na

jabłkach było zbyt kwaśne środowisko (pH) owocu, które wpływało hamująco na aktywność tego rodzaju bakteriofagów. W innym doświadczeniu Leverenz i wsp. [17] sprawdzili również skuteczność połączenia bakteriofagów z powszechnie stosowaną w produkcji serów niziną (konserwant o symbolu E234). Badacze zaobserwowali synergistyczny efekt po zaaplikowaniu fagów i nizyny w postaci oprysków na jabłka i melony.

Terapia fagowa w leczeniu zwierząt hodowlanych

Do patogenów powszechnie występujących w żywności pochodzenia zwierzęcego należą m.in. gatunki *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Escherichia coli* oraz *Campylobacter jejuni* [22].

Gram ujemna bakteria *E. coli* jest częstą przyczyną zatruc pokarmowych. Zakażenie może nastąpić wskutek spożycia już dziesięciu komórek tej bakterii, znajdujących się w niedogotowanym mięsie lub w mleku mającym kontakt z odchodami zwierząt [22]. Dotychczasowe badania skupiały się na dopracowywaniu efektywności terapii fagowej stosowanej głównie w leczeniu drobiu hodowlanego, gdyż duża gęstość osobników na stosunkowo niewielkiej powierzchni sprzyja szybkiemu rozprzestrzenianiu się infekcji powodowanej przez tę bakterię. Xie i wsp. [29] porównali efektywność bakteriofagów Esc-A przeciwko szczepom *E. coli* z efektywnością chloromycetyny (handlowa nazwa antybiotyku – chloramfenikol). Kurczęta traktowane preparatem fagowym charakteryzowały się mniejszą częstotliwością występowania objawów zakażenia (jedynie 26 % populacji stanowiły kurczęta zakażone) w porównaniu z ptakami leczonymi chloromycetyną (36 % populacji stanowiły kurczęta zakażone) oraz w odniesieniu do nieleczzonej grupy kontrolnej (51,6 % populacji stanowiły kurczęta zakażone). Ponadto preparat fagowy ograniczył śmiertelność drobiu o ok. 12,8 % w porównaniu z grupą kontrolną. Stosowanie antybiotyków pozwoliło natomiast na ograniczenie śmiertelności drobiu tylko o 8 % w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki te potwierdzają możliwość wykorzystania bakteriofagów do zmniejszenia częstotliwości zakażeń wywołanych przez *E. coli*. Huff i wsp. [15] również potwierdzili skuteczność bakteriofagów w zwalczaniu infekcji *E. coli* drobiu, jednak badacze skupili się na określeniu najskuteczniejszej metody aplikacji koktajli fagowych. Dowiedli oni, że najskuteczniejszym sposobem aplikacji jest podawanie fagów w postaci rozpylanego w powietrzu sprayu. Nieefektywne okazało się podawanie fagów z karmą i wodą do picia. Komercyjnie dostępnym na rynku preparatem zawierającym bakteriofagi przeciwko *E. coli* jest EcoShieldTM wyprodukowany przez firmę Intralytix, który został dopuszczony przez FDA (*American Food and Drug Administration*) do użytku w 2011 roku i uzyskał status GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Eliminuje on 95 ÷ 100 % komórek *E. coli* [22].

Do patogenów równie często wywołujących epidemie wśród drobiu zaliczane są serotypy *Salmonella enterica*: Typhimurium oraz Enteritidis [22]. Wyniki doświadczeń Atterburego i wsp. [1] potwierdzają skuteczność podawanej kurczętom doustnie mieszanki specyficznych fagów przeciwko serotypom Enteritidis i Typhimurium. Koktajl fagowy rozpuszczony w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) z dodatkiem 30 % CaCO₃ redukował kolonizację jelit kurcząt przez *S. Enteritidis* o 4,2 log jtk w ciągu 24 h w porównaniu z kontrolną grupą kurcząt nietraktowanej fagami. Zmniejszenie kolonizacji w przypadku *S. Typhimurium* wynosiło 2,19 log jtk w ciągu 24 h w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Dostępne na rynku preparaty bakteriofagowe przeciwko serotypom *Salmonella* to m.in. [22]:

- BacWash (OmniLytics Inc.), który w 2007 r. dopuszczono do stosowania w postaci sprayu do odkażania zwierząt przed ubojem,
- BIOTECTOR® S1 (CheilJedang Co.), który może być stosowany w celu biokontroli szczepów *Salmonella* u drobiu. Rekomenduje się zaaplikowanie go w postaci składnika paszy dla zwierząt.

Najczęstszą przyczyną zatruc pokarmowych na świecie jest Gram ujemna, spiralna bakteria *Campylobacter jejuni*. Jej źródłem jest bydło oraz drób [22]. Wagenaar i wsp. [27] badali możliwości wykorzystania bakteriofagów specyficznych dla *C. jejuni* do zapobiegania zakażeniom oraz leczenia istniejącej już infekcji. Prewencyjne stosowanie mieszanki fagów opóźniało kolonizację jelita kurcząt przez chorobotwórczą bakterię, natomiast leczenie wywołanej uprzednio infekcji zmniejszyło liczbę bakterii *C. jejuni* o 3 log w porównaniu z nieleczoną grupą kontrolną. Po tygodniu leczenia różnica poziomu występowania w jelitach *C. jejuni* między grupą poddaną fagoterapii a grupą kurcząt nietraktowanych fagami wynosiła tylko 1 log.

Kapsułkowanie

Powszechnie stosowaną metodą chroniącą bakteriofagi przed niekorzystnymi warunkami panującymi w żołądku (niskie pH, obecność enzymów trawiennych) jest kapsułkowanie. Enkapsulacja mikroorganizmów polega na powlekanii komórek odpowiednią powłoką (hydrokolidami), która pozwala na uwolnienie zawartości z kontrolowaną szybkością i pod wpływem odpowiednich czynników. Kapsułka stwarza mikrośrodowisko chroniące bakteriofagi nie tylko przed warunkami panującymi w przewodzie pokarmowym, ale również pozwala przetrwać warunki przechowywania, osuszania, i przetwarzania produktów spożywczych. Metodą często wykorzystywaną w kapsułkowaniu mikroorganizmów jest emulsyfikacja [8]. Polega ona na rozproszeniu fazy nieciągłej składającej się z mikroorganizmów i polimeru w fazie ciągłej, którą stanowi olej roślinny. Jest to metoda wykorzystywana do enkapsulacji bakterii probiotycznych. Metodę tę zastosowano do bakteriofagów. Murthy i Engel-

hardt [21] opatentowali metodę kapsułkowania, w której fagi immobilizowali na odtłuszczonym mleku w proszku i zamykali w kapsułkach składających się z kwasu palmitynowego oraz stearynowego. Preparat wytrzymał dłuższe okresy ekspozycji na pH o wartości 2,15 niż preparaty niekapsułkowane. Wskazuje to na możliwość stosowania preparatu bezpośrednio dla zwierząt lub jako dodatku do pasz.

Potencjalne zalety wykorzystania fagów w przemyśle spożywczym

W celu zlikwidowania w żywności potencjalnie patogennych mikroorganizmów, w zakładach przetwórstwa spożywczego stosuje się metody chemiczne i fizyczne, w tym promieniowanie UV [26]. Metody te nie zapewniają jednak 100-procentowej skuteczności.

Preparaty bakteriofagowe w przemyśle spożywczym można wykorzystywać do zapobiegania i eliminowania skażeń produktów pochodzących od zwierząt hodowlanych, zwalczania drobnoustrojów występujących na sprzętach i powierzchniach mających kontakt z żywnością w czasie jej obróbki lub do bezpośredniej inaktywacji drobnoustrojów w żywności [10, 22, 25].

Wśród zalet preparatów bakteriofagowych można wymienić to, że:

- jako wirusy specyficzne nie niszczą naturalnej i pożądanej mikroflory żywności oraz bioty komensalnej przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt [12, 22, 25],
- można je stosować w małych dawkach ze względu na zdolność namnażania się fagów w komórkach gospodarzy [12, 22],
- nie wykazują toksyczności wobec organizmów ludzi i zwierząt [22],
- nie zmieniają właściwości sensorycznych produktów spożywczych [22],
- wytrzymują stres środowiskowy podczas obróbki żywności [22, 25].

Coraz częściej fagi wykorzystuje się do inaktywacji bakterii występujących na powierzchniach sprzętu w zakładach przetwarzających żywność. Preparaty bakteriofagowe w przeciwieństwie do standardowych chemicznych środków bakteriobójczych nie powodują korozji sprzętu, a skuteczność ich działania przeciwko np. *L. monocytogenes* i *E. coli* O157:H7 została doświadczalnie potwierdzona na powierzchniach twardych, takich jak stal nierdzewna czy szkło [23]. Przy stosowaniu zarówno chemicznych środków biobójczych, jak i preparatów fagowych, należy zwrócić uwagę na czas odstępu pomiędzy zastosowaniem obu tych czynników, gdyż wiele środków dezynfekujących, w tym alkohol etylowy i podchloryn sodu, hamuje aktywność bakteriofagów [24, 26].

Aktywność bakteriofagów przeciwko biofilmowi

Częstym problemem w przemyśle spożywczym jest tworzenie biofilmu przez komórki bakteryjne na powierzchni maszyn i urządzeń. Biofilm tworzy wielowarstwowe skupisko komórek bakteryjnych lub bakteryjnych i grzybiczych, otoczonych

polisacharydową substancją pozakomórkową EPS (*Extracellular Polymeric Substances*). Taka struktura umożliwia komórkom bakteryjnym przetrwanie trudnych warunków i wytworzenie oporności na substancje dezynfekujące. Kelly i wsp. [22] zbadali zdolność hamowania rozwoju biofilmu przez bakteriofagi. W doświadczeniu użyli mieszanki bakteriofagów przeciwko bakteriom *Staphylococcus aureus*. Najwyższy stopień hamowania tworzenia się biofilmu zaobserwowano po 48 h, natomiast największą redukcję biomasy utworzonego biofilmu – po 72 h. Wymienieni autorzy wykazali, że czas ekspozycji biofilmu na działanie bakteriofaga ma kluczowe znaczenie w jego redukcji. Sprawdzona została również zdolność fagów P100 (preparat Listex P100) w redukcji biofilmu formowanego przez *L. monocytogenes* [23]. Testowano aktywność bakteriofagów na biofilmie znajdującym się na powierzchni stali nierdzewnej. Redukcja *L. monocytogenes* z użyciem bakteriofagów specyficznych do tej bakterii wynosiła $3,5 \div 5,4 \log/\text{cm}^2$ w porównaniu z powierzchnią kontrolną, nietraktowaną fagami.

Biosensory

Równie istotne jak kontrola i zwalczanie patogenów w żywności jest ich szybkie i wczesne wykrywanie. Tradycyjne metody mikrobiologiczne, choć dokładne, są czasochłonne i niemożliwe do przeprowadzenia w miejscu produkcji ze względu na potrzebę izolacji i inkubacji bakterii [10]. Zdaniem Goodridge'a i wsp. [14], dzięki degradacji komórek bakteryjnych przez lizyny bakteriofagów, wydostający się na zewnątrz materiał komórki może być wychwytywany i oznaczany za pomocą kilku technik. Najczęściej jest to technika wychwytyjąca ATP przy użyciu układu enzymatycznego lucyferaza/lucyferyna. Stężenie uwalnianego ATP jest wprost proporcjonalne do intensywności bioluminescencji uzyskanej w wyniku reakcji lucyferaza/lucyferyna. Kolejną metodą wykrywania m.in. *E. coli* 0157:H7 jest znakowanie barwnikiem fluorescencyjnym kwasu nukleinowego bakteriofaga. Znakowane fagi infekują specyficzne dla siebie komórki bakteryjne, a następnie mogą być wykryte przy użyciu metod mikroskopii konfokalnej, epifluorescencyjnej oraz cytometrii przepływowej.

Podsumowanie

Bakteriofagi wywierają zarówno pozytywny (środki ochrony żywności, terapia fagowa), jak i negatywny (niszczenie kultur starterowych używanych w produkcji przetworów mleczarskich) wpływ na żywność. Szeroki zakres zastosowań bakteriofagów w łańcuchu żywnościowym może istotnie zredukować liczbę zatruć pokarmowych, co wiąże się również ze znacznym obniżeniem kosztów związanych z leczeniem i stratami w produkcji żywności. W obecnych czasach, gdy naukowcy zmagają się z narastającym problemem antybiotykooporności, bakteriofagi mogą zostać uznane za jedną z ważniejszych alternatyw dla medycyny weterynaryjnej.

Literatura

- [1] Atterbury R.J., van Bergen M.A.P., Ortiz F., Lovell M.A., Harris J.A., De Boer A., Wagenaar J.A., Allen V.M., Barrow P.A.: Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73** (14), 4543-4549.
- [2] Atterbury R.J.: Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. *Microb. Biotechnol.*, 2009, **2** (6), 601-612.
- [3] Balogh B., Jones J.B., Momol M.T., Olson S.M., Obradovic A., King P., Jackson L.E.: Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Dis.*, 2003, **87** (8), 949-954.
- [4] Balogh B., Canteros B.I., Stall R.E., Jones J.B.: Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. *Plant Dis.*, 2008, **92** (7), 1048-1052.
- [5] Balogh B., Jones J.B., Iriarte F.B., Momol M.T.: Phage therapy for plant disease control. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2010, **11** (1), 48-57.
- [6] Brovko L.Y., Anany H., Griffiths M.W.: Bacteriophages for detection and control of bacterial pathogens in food and food – processing environment. *Adv. Food Nutr. Res.*, 2012, **67**, 241-288.
- [7] Bruttin A., Brussow H.: Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: A safety test of phage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, **48** (7), 2874-2878.
- [8] Choińska-Pulińska A., Mituła B., Śliwka P., Łaba W., Skaradzińska A.: Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends Food Sci. Technol.*, 2015, **45**, 212-221.
- [9] 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.
- [10] Endersen L., O'Mahony J., Hill C., Ross R.P., McAuliffe O., Coffey A.: Phage therapy in the food industry. *Ann. Rev. Food Sci. Technol.*, 2014, **5**, 327-349.
- [11] Gill J., Abedon S.T.: Bacteriophage Ecology and Plants., APSnet Feature., 2003. Dostęp w Internecie [30.12.1015.]: <http://www.apsnet.org/online/feature/phages/>.
- [12] Gilmore B.: Bacteriophages as anti-infective agents: recent developments and regulatory challenges. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2012, **10** (5), 533-535.
- [13] Goodridge L.D.: Bacteriophage biocontrol of plant pathogens: Fact or fiction. *Trends Biotechnol.*, 2004, **22** (8), 384-385.
- [14] Goodridge L., Abedon T.: Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: Application of phage therapy to industry. *SIM News.*, 2003, **53**, 254-262.
- [15] Huff W.E., Huff G.R., Rath N.C., Balog J.M., Xie H., Moore P.A., Jr., Donoghue A.M.: Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02). *Polutry Sci.*, 2002, **1**, 437-441.
- [16] Leverentz B., Conway W.S., Alavidze Z., Janisiewicz W.J., Fuchs Y., Camp J.M., Chighladze E., Sulakvelidze A.: Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: A model study. *J. Food Prot.*, 2001, **64** (8), 1116-1121.
- [17] Leverentz B., Conway W.S., Camp M.J., Janisiewicz W.J., Abuladze T., Yang M., Saftner R., Sulakvelidze A.: Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69** (8), 4519-4526.
- [18] 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.
- [19] Knoll B.M., Mylonakis E.: Antibacterial bioagents based on principles of bacteriophage biology: An Overview. *Clin. Infect. Dis.*, 2014, **58** (4), 528-534.
- [20] Mahony J., McAuliffe O., Ross R.P., van Sinderen D.: Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2010, **22**, 1-7.
- [21] Murthy K., Engelhardt R.: Encapsulated bacteriophage formulation. International Patent, US 2012/0258175 A1.

- [22] Sillankorva S.M., Oliveira H., Azeredo J.: Bacteriophages and their role in food safety. *Int. J. Microbiol.*, 2012, article ID 863945.
- [23] Soni K.A., Nannapaneni R.: Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. *J. Food Protect.*, 2010, **73** (8), 1519-1524.
- [24] Starostka S., Olejnik-Schmidt A., Schmidt M.: Zastosowanie bakteriofagów jako środków ochrony żywności. Cz. 1. *Przem. Spoż.*, 2014, **68** (2), 30-32.
- [25] Starostka S., Olejnik-Schmidt A., Schmidt M.: Zastosowanie bakteriofagów jako środków ochrony żywności. Cz. 2. *Przem. Spoż.*, 2014, **68** (3), 16-17.
- [26] Sulakvelidze A.: Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens. *J. Sci. Food Agric.*, 2013, **93**, 3137-3146.
- [27] Wagenaar J., van Bergen M.A.P., Mueller M.A., Wassenaar T.M., Carlton R.M.: Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet. Microbiol.*, 2005, **109**, 275-283.
- [28] 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.
- [29] Xie H., Zhuang X., Kong J., Ma G., Zhang H.: Bacteriophage Esc-A is an efficient therapy for *Escherichia coli* 3-1 caused diarrhea in chickens. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2005, **51**, 159-163.

UTILISATION OF BACTERIOPHAGES IN THE FOOD CHAIN

S u m m a r y

Bacteriophages are bacterial viruses discovered at the beginning of the 20th century. Insufficient knowledge of the biology of phages and the intense development of antibiotic therapy caused the interest of scientists in bacteriophages to decline right away after the discovery thereof. Attempts are now being made to solve the problem of microbiological safety of food through the use of bacteriophages in the whole food chain including the direct elimination of bacteria from the surface of food and of the surface of equipment contacting food. The ability to infect exclusively specific bacterial cells, no impact on the corrosion of equipment and surfaces in food processing plants, and no effects on the sensory characteristics of food products are those significant advantages of phages, which call for applying them as food protecting means. Veterinary medicine struggles with a very widespread problem of antibiotic resistance; therefore, the potential is explored of bacteriophages used as agents in preventing and treating bacterial infections in breeding animals. To this purpose, the phages are applied in the form of aerosols or they are placed in capsules designed to ensure protection against inactivation by the low pH of gastric acid. The hitherto conducted studies also confirm that bacteriophages do not have any significant toxic effect on organisms of people and animals. The phages are an attractive alternative to the up to now applied antibiotics and disinfectants. Based on a wide range of applications of phages in the food chain, it is possible to significantly reduce the number of food poisoning in the world.

The objective of this study was to present the most recent literature data on the application of bacteriophages at each stage of the food production chain commonly called "from farm to table" and to introduce the latest research on the use of bacteriophages to quickly and easily detect bacterial pathogens in food.

Key words: bacteriophages, pathogens, encapsulation, biosensors 