



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU

Rozprawa doktorska

**Biofilmy w produkcji żywności i rola
bakteriofagów w ich eradykacji**

mgr inż Paweł Korzeniowski

Praca wykonana pod kierunkiem
prof dr hab inż Waldemara Rymowicza
w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Wydziału Biotechnologii i Nauk Żywności

Wrocław 2023

Pragnę złożyć szczególne podziękowania:

*Panu promotorowi **prof dr hab inż Waldemarowi Rymowiczowi**
za możliwość pracy pod Jego kierunkiem, opiekę naukową oraz okazaną życzliwość*

*Pani **dr inż Marcie Kuźmińskiej-Bajor**
za opiekę naukową, dobrą radę i pomoc, bez których realizacja pracy nie byłaby
możliwa*

***Koleżankom i Kolegom z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności**
za serdeczność, życzliwość, pomoc i miłą atmosferę pracy*

***Kochanej żonie**
za wsparcie w trudnych i łatwych chwilach*

***Rodzinie i przyjaciołom**
za troskę, cierpliwość i motywację*

Wykaz skrótów

Abs	absorbancja
AHL	Ustawa o zdrowiu zwierząt (ang. Animal Health Law)
APEC	patogenne dla drobiu <i>Escherichia coli</i> (ang. Avian pathogenic <i>Escherichia coli</i>)
CCD	urządzenie ze sprzężeniem ładunkowym (ang. charge-coupled device)
eDNA	pozakomórkowe DNA (ang. extracellular DNA)
EFSA	Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Agency)
EnPEC	endometrialne patogenne <i>Escherichia coli</i>
EPS	polisacharydowe substancje pozakomórkowe (ang. extracellular polymeric substances)
ExPEC	Pozajelitowe patogenne szczepy <i>Escherichia coli</i> (ang. Extraintestinal Pathogenic <i>Escherichia coli</i>)
ICTV	Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ang. International Committee on Taxonomy of Viruses)
jtk.	jednostka tworząca kolonię
LB	bulion lizogenny (ang. Lysogeny Broth)
MDa	megadalton
MPEC	patogenne dla ssaków <i>Escherichia coli</i> (ang. mammal pathogenic <i>Escherichia coli</i>)
NMEC	<i>Escherichia coli</i> związane z zapaleniem opon mózgowych (Neonatal meningitis-causing <i>Escherichia coli</i>)
OD	gęstość optyczna (ang. Optical Density)
ODc	średnica zewnętrzna odcięcia (ang. outer diameter cut-off)
PBS	bufor fosforanowy (ang. Phosphate Buffered Saline)
PFU	jednostka tworząca łyśinkę (ang. Plaque Forming Unit)
pz	para zasad
rpm	obroty na minutę (ang. revolutions per minute)
RTD	Rutynowe rozcieńczenie testowe (ang. Routine Test Dilution)
SEPEC	powodujące sepsę <i>Escherichia coli</i> (ang. Human sepsis-associated <i>Escherichia coli</i>)
SGF	symulowany bufor żołądkowy (ang. Simulated Gastric Fluid)

UPEC uropatogenne *Escherichia coli* (ang. uropathogenic *Escherichia coli*)
WHO Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)
YE ekstrakt drożdżowy (ang. yeast extract)

Spis treści

Wykaz skrótów.....	3
Streszczenie.....	9
Abstract.....	11
1. Wstęp:	13
1.1 Zakażenia pałeczkami <i>Salmonella</i> Enteritidis u człowieka	13
1.2 Zakażenia pałeczkami <i>Salmonella</i> Enteritidis u drobiu.....	13
1.3 Pozajelitowe patogenne <i>Escherichia coli</i>	15
1.4 Patogenne dla drobiu <i>Escherichia coli</i>	15
1.5 Problem lekooporności u bakterii izolowanych od drobiu	17
1.6 Lekooporność pałeczek <i>Salmonella</i>	17
1.7 Lekooporność patogennych dla drobiu <i>Escherichia coli</i>	18
1.8 Bakteriofagi	19
1.9 Historia badań nad bakteriofagami	20
1.10 Budowa bakteriofagów.....	21
1.11 Cykle replikacyjne bakteriofagów.....	23
1.12 Terapia fagowa.....	25
1.13 Zastosowanie bakteriofagów u drobiu.....	26
1.14 Biofilm bakteryjny	27
1.15 Historia badań nad biofilmem.....	27
1.16 Tworzenie biofilmu	28
1.17 Występowanie biofilmów	30
1.18 Biofilm pałeczek <i>Salmonella</i> Enteritidis	30
1.19 Biofilm <i>Escherichia coli</i> patogennych dla drobiu.....	31
1.20 Zdolność bakteriofagów do redukcji biofilmu.....	32
2. Cele i założenia	34
3 Materiały i metody	35
3.1 Materiały.....	35
3.1.1 Aparatura	35

3.1.2 Podłoża mikrobiologiczne.....	35
3.1.3 Bufory i roztwory	36
3.1.4 Odczynniki chemiczne:.....	37
3.1.5 Zwierzęta eksperymentalne.....	37
3.1.6 Szczepy bakterii	37
3.1.7 Bakteriofagi.....	38
3.2 Metody.....	40
3.2.1 Namnażanie bakterii	40
3.2.2 Oznaczanie liczb bakterii.....	40
3.2.3 Namnażanie bakteriofagów.....	40
3.2.4 Routine Test Dilution (RTD) (Adams, 1959)	41
3.2.5 Oznaczenie liczby bakteriofagów metodą płytek dwuwarstwowych	41
3.2.6 Analiza stabilności bakteriofagów UPWr_S1-5.....	42
3.2.7 Redukcja biofilmu <i>Salmonella</i> Enteritidis na płytkach 96- dołkowych.....	43
3.2.8 Redukcja biofilmu <i>Salmonella</i> Enteritidis na powierzchni stali nierdzewnej.....	45
3.2.9 Redukcja biofilmu <i>Salmonella</i> Enteritidis na powierzchni liści sałaty.....	46
3.2.10 Redukcja biofilmu <i>Salmonella</i> Enteritidis na powierzchni poidel dla drobiu w warunkach <i>in vitro</i>	48
3.2.11 Eradykacja pałeczek <i>Salmonella</i> z powierzchni poidel dla drobiu na modelu eksperymentalnie zakażonych kurcząt	49
3.2.12 Analiza stabilności bakteriofagów UPWr_E1-4.....	51
3.2.13 Redukcja biofilmu patogennych dla drobiu <i>E. coli</i> na płytkach 96-dołkowych.....	51
3.2.14 Redukcja biofilmu tworzonego przez patogenne dla drobiu <i>E. coli</i> na powierzchni stali nierdzewnej.....	53
3.2.15 Redukcja biofilmu tworzonego przez patogenne dla drobiu <i>E. coli</i> na powierzchni liści sałaty	54
3.2.16 Redukcja biofilmu tworzonego przez patogenne dla drobiu <i>E. coli</i> na powierzchni mięsa drobiowego	55
3.2.17 Analiza statystyczna	57
4. Wyniki	58

4.1 Ocena zdolności bakteriofagów UPWr_S1-5 do redukcji pałeczek <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	58
4.1.1 Namnażanie bakteriofagów UPWr_S1-5.....	58
4.1.2 Zdolność tworzenia biofilmu przez pałeczki <i>Salmonella</i> Enteritidis	58
4.1.3 Aktywność bakteriofagów w zależności od pH środowiska	59
4.1.4 Aktywność bakteriofagów UPWr_S1-5 w środowisku symulowanego kwasu żołądkowego kurcząt SGF	60
4.1.7 Degradacja biofilmu tworzego przez <i>Salmonella</i> Enteritidis na powierzchni płytek 96-dółkowych	63
4.1.8 Degradacja biofilmu tworzego przez <i>Salmonella</i> Enteritidis na powierzchni stali nierdzewnej.....	65
4.1.9 Redukcja biofilmu tworzego przez pałeczki <i>Salmonella</i> Enteritidis na powierzchni liści sałaty	67
4.1.10 Redukcja liczby pałeczek <i>Salmonella</i> Enteritidis na powierzchni poidel dla drobiu w warunkach <i>in vitro</i>	69
4.1.11 Eliminacja pałeczek <i>Salmonella</i> Enteritidis 327 lux z powierzchni poidel dla drobiu na modelu eksperymentalnie zakażonych kurcząt.....	71
4.1.12 Redukcja liczby pałeczek <i>Salmonella</i> Enteritidis 327 lux w narządach eksperymentalnie zakażonych kurcząt	72
4.2 Ocena zdolności bakteriofagi UPWr_E1-4 do redukcji patogennych dla drobiu <i>E. coli</i>	74
4.2.1 Namnażanie bakteriofagów UPWr_E1-4.....	74
4.2.2 Zdolność tworzenia biofilmu przez szczepy APEC	74
4.2.3 Aktywność bakteriofagów UPWr_E1-4 w środowisku symulowanego kwasu żołądkowego kurcząt SGF	75
4.2.5 Degradacja biofilmu tworzego przez patogenne dla drobiu <i>Escherichia coli</i> na powierzchni płytek 96-dółkowych.....	78
4.2.6 Degradacja biofilmu tworzego przez patogenne dla drobiu <i>Escherichia coli</i> na powierzchni stali nierdzewnej	80
4.2.7 Redukcja biofilmu tworzego przez patogenne dla drobiu <i>Escherichia coli</i> na powierzchni liści sałaty	82
4.2.8 Redukcja biofilmu tworzego przez <i>Escherichia coli</i> na powierzchni mięsa drobiowego.....	83
5. Dyskusja.....	86

5.1 Rola bakteriofagów w zwalczaniu biofilmu tworzonego przez <i>S. Enteritidis</i>	86
5.2 Rola bakteriofagów w zwalczaniu biofilmu patogennych dla drobiu <i>E. coli</i>	92
6. Wnioski	97
7. Bibliografia	99

Streszczenie

Pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, w tym *Salmonella* oraz *Escherichia coli* w środowisku naturalnym tworzą biofilmy, czyli przestrzenne struktury wielokomórkowe drobnoustrojów wykazujące zdolność do przylegania do abiotycznych powierzchni stałych lub powierzchni komórek organizmów wyższych. Ich funkcją, poza adhezją do podłoża, jest ochrona drobnoustrojów przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi, w tym środkami przeciwdrobnoustrojowymi. Ta cecha biofilmu skutkuje trudnościami w eliminowaniu bakterii wchodzących w jego strukturę.

Bakteriofagi to wirusy zdolne do namnażania wyłącznie wewnątrz komórek bakterii. Dzięki zdolności do infekcji wyłącznie komórek gospodarza należących do jednego gatunku, bądź nawet szczepu bakterii mogą być stosowane przeciwko ściśle określonym drobnoustrojom. Bakteriofagi stanowią jedną z badanych przez naukowców metod zwalczania bakterii w tym patogennych, których źródłem jest żywność, wykazujących się zdolnością do tworzenia form osiadłych, przez co mogą one zostać wykorzystana do usunięcia bakterii z tych struktur znajdujących się na powierzchni żywności i urządzeń stosowanych w procesie wytwarzania żywności i zwalczania groźnych dla ludzi bakterii, ze szczególnym uwzględnieniem drobnoustrojów o wysokiej oporności na chemioterapeutyki.

Pałeczki *Salmonella* Enteritidis u człowieka wywołują jedną z najczęściej występujących chorób odzwierzęcych, salmonelozę, jedną z najczęściej występujących chorób odzwierzęcych. Głównym źródłem infekcji tym patogenem jest spożycie skażonej żywności, najczęściej pochodzenia drobiowego. Pałeczki *Salmonella* zdolne są do przetrwania na fermach drobiu, powierzchni roślin oraz na powierzchniach maszyn przemysłu produkcji żywności ze względu na zdolność do tworzenia biofilmu. Celem niniejszej pracy było wykorzystanie bakteriofagów UPWr_S1-5 oraz koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 do eliminowania pałeczek *Salmonella* Enteritidis ze struktur biofilmu utworzonego na powierzchniach takich jak polipropylen (plastik), stal czy liście sałaty.

Przeprowadzone badania wykazały znaczną skuteczność zarówno pojedynczych bakteriofagów UPWr_S1-5 jak i koktajlu bakteriofagów w zwalczaniu biofilmu utworzonego przez pałeczki *Salmonella* Enteritidis na powierzchni polipropylenu, stali nierdzewnej oraz powierzchni sałaty. Dodatkowo, wykazano skuteczność tych bakteriofagów w zwalczaniu biofilmu nawet przy zastosowaniu niskich mian.

Kolejnym etapem przeprowadzonych badań było zastosowanie koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 w zwalczaniu biofilmu utworzonego przez pałeczki *Salmonella* na poidłach dla drobiu w warunkach laboratoryjnych oraz eliminacji tych patogenów z biofilmu wielogatunkowego obecnego na poidłach dla drobiu w trakcie hodowli kurcząt. Badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* wykazały ograniczenie liczby patogenów obecnych na powierzchni poidła. W warunkach hodowlanych wykazano natomiast całkowitą eliminację pałeczek *Salmonella* z biofilmu obecnego na poidłach dla drobiu. Wskazuje to na duży potencjał aplikacyjny koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 w przemyśle drobiarskim.

Patogenne dla drobiu *Escherichia coli* (APEC) posiadają zdolność do infekcji drobiu powodując kolibakteriozę, zespół chorobowy stanowiący znaczne zagrożenie dla zdrowia i życia nie tylko zwierząt hodowlanych, ale również, jako potencjalne źródło genów oporności na chemioterapeutyki, które mogą zostać przeniesione na patogeny ludzkie, również dla zdrowia człowieka. Patogeny te są źródłem strat ekonomicznych przemysłu produkcji drobiarskiej. Podobnie jak pałeczki *Salmonella*, patogenne dla drobiu *E. coli* zdolne są do tworzenia biofilmu, co skutkuje ich zwiększoną zdolnością do przetrwania na fermach drobiu, powierzchni roślin, powierzchni maszyn oraz tuszek drobiowych. Celem niniejszej pracy było wykorzystanie bakteriofagów UPWr_E1-4 oraz koktajlu bakteriofagów UPWr_E124 do zwalczania biofilmu tworzonego przez patogenne dla drobiu *Escherichia coli* na powierzchni polipropylenu, stali, liści sałaty oraz mięsa drobiowego. Bakteriofagi UPWr_E1-4 charakteryzują się litycznym cyklem namnażania oraz szerokim spektrum litycznym, zdolne są m.in. do infekcji *Klebsiella pneumoniae*.

Wykazano skuteczność zawiesin bakteriofagów UPWr_E1-4 oraz koktajlu bakteriofagów UPWr_E124 w zwalczaniu biofilmu tworzonego przez patogenne dla drobiu *Escherichia coli* na powierzchniach biotycznych oraz abiotycznych. Wyniki analiz stosowania zawiesin tych bakteriofagów w zapobieganiu rozwojowi tych patogenów na powierzchni mięsa drobiowego w warunkach chłodniczych wskazują dodatkowo na potencjalne zastosowanie aplikacyjne bakteriofagów UPWr_E1-4 w ograniczaniu wzrostu *Escherichia coli* na powierzchni przechowywanego mięsa.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują na możliwość skutecznego stosowania bakteriofagów UPWr_S1-5 oraz UPWr_E1-4 w zwalczaniu biofilmu utworzonego odpowiednio przez pałeczki *Salmonella* Enteritidis oraz *Escherichia coli*.

Abstract

Bacteria belonging to family *Enterobacteriaceae* such as *Salmonella* and *Escherichia coli* in the natural environment form biofilms, i.e. spatial multicellular structures of microorganisms adhered to abiotic solid surfaces or the surface of cells of higher organisms. Apart from adhesion to the substrate, function of biofilm is protection of microorganisms against adverse external factors, including antimicrobial agents. This feature of biofilm results in difficulties in bacterial combating

Bacteriophages are viruses capable of multiplying within bacterial cells. Due to the ability to infect only bacteria cells belonging to one species or even a single strain of bacteria, they can be used against very specific group of microorganisms. Bacteriophages are mentioned as a method of combating bacteria of food origin, especially pathogens, whose source is food, showing the ability to create sessile forms, so phages can be used to remove bacteria from these structures formed on food and on devices used in the food production process and to combat bacteria dangerous to humans, including highly resistant to chemotherapeutic agents.

Salmonella Enteritidis in humans causes salmonellosis, one of the most common zoonotic diseases. The main source of infection by this pathogen is the consumption of contaminated food, mostly contaminated poultry products such as meat and eggs. *Salmonella* is able to survive on poultry farms, plant surfaces and on the surfaces of machinery in the food production industry due to its ability to form a biofilm. The aim of this study was to use the UPWr_S1-5 bacteriophages and the UPWr_S134 bacteriophage cocktail to eradicate *Salmonella* Enteritidis biofilm formed in *in vitro* and *in vivo* conditions on surfaces such as polypropylene, steel or lettuce leaves.

In this study a significant effectiveness of both single UPWr_S1-5 bacteriophages and a cocktail of bacteriophages in combating the biofilm formed by *Salmonella* Enteritidis on the surface of polypropylene, stainless steel and the surface of lettuce leaves was indicated. In addition, the effectiveness of these bacteriophages in combating biofilms has been demonstrated even at significant dilutions of their suspensions.

The next stage of the research was the use of the UPWr_S134 bacteriophage cocktail to combat the biofilm formed by *Salmonella* on poultry drinkers in laboratory conditions and to eliminate these pathogens from the multispecies biofilm present on poultry drinkers during chicken breeding. *In vitro* studies have shown a consistent reduction in the number of pathogens present on the surface of the drinkers. However, in farming conditions, the complete elimination

of *Salmonella* from the biofilm present on the poultry drinkers was demonstrated. This indicates a great application potential of the UPWr_S134 bacteriophage cocktail in the poultry industry.

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) possess the ability to infect chickens, causing colibacillosis, a disease syndrome that is a significant threat to the health and life of not only poultry, but also could be a potential source of antibiotic resistance genes that can be transferred to human pathogens, also for human health . These pathogens are the source of significant economic losses in the production industry. Like *Salmonella*, avian pathogenic *E. coli* is able to form a biofilm, which results in its increased ability to survive on poultry farms, plant surfaces, machine surfaces and poultry carcasses. The aim of this study was to use UPWr_E1-4 bacteriophages and a bacteriophage cocktail UPWr_E124 to combat APEC strain in biofilm formed on the surface of polypropylene, steel, lettuce leaves and poultry meat.

The effectiveness of the UPWr_E1-4 bacteriophage and the UPWr_E124 bacteriophage cocktail in combating the biofilm created by avian pathogenic *E. coli* on biotic and abiotic surfaces was demonstrated. The results of analyzes of the use of suspensions of these bacteriophages in preventing the development of these pathogens on the surface of poultry meat in refrigeration conditions additionally indicate the potential application of UPWr_E1-4 bacteriophages in limiting the growth of *Escherichia coli* on the surface of stored meat.

The results obtained in this study indicate the possibility of effective use of the UPWr_S1-5 and UPWr_E1-4 bacteriophages in combating the biofilm formed by two pathogenic bacteria: *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli*, respectively.

1. Wstęp:

1.1 Zakażenia pałeczkami *Salmonella* Enteritidis u człowieka

Salmonella enterica serowar Enteritidis to należące do rodziny *Enterobacteriaceae* pałeczki gram-ujemne powodujące salmonelozę, drugą najczęściej zgłaszaną chorobę odzwierzęcą u ludzi. Głównym źródłem zakażeń tymi drobnoustrojami jest skażona żywność (The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020, 2022). Serowar *S. Enteritidis* jest najczęściej izolowanym z żywności serowarem w krajach rozwiniętych (Patrick i in., 2004). Infekcje powodowane przez pałeczki *Salmonella* Enteritidis u człowieka przejawiają się w 2 podstawowych formach klinicznych. Pierwszą z nich jest zapalenie jelit (gastroenteritis), które najczęściej objawia się zaburzeniami trawienia, wzdęciami i tkliwością brzucha i krwistymi stolcami (Neu i Walker, 2011). U osób z obniżoną odpornością może dojść do transmisji patogenów do krwioobiegu, co skutkuje zapaleniem takich organów jak mózg czy płuca, a w skrajnych przypadkach posocznicą (Mizel i in., 1995). Drugą formą zakażenia jest dur brzuszny. Jego typowe objawy obejmują różowe plamy na skórze, bradykardię i gorączkę, dodatkowo występują objawy żołądkowo-jelitowe takie jak ból brzucha, zapalenie pęcherzyka żółciowego i zapalenie dróg żółciowych (Crum, 2003). Zapalenie jelit powodowane jest najczęściej przez serowar *S. Enteritidis*, natomiast za dur brzuszny odpowiedzialne są serowary typowe dla człowieka i innych naczelnych takie jak *S. Typhi* i *S. Paratyphi* (Formal i in., 1975; Santos i in., 2001).

1.2 Zakażenia pałeczkami *Salmonella* Enteritidis u drobiu

U drobiu, w przypadku dorosłych ptaków, zakażenie pałeczkami *Salmonella* Enteritidis najczęściej przebiega bezobjawowo. Ich obecność często jednak skutkuje osłabieniem ptaków i spowolnieniem wzrostu i rozwoju. Natomiast u piskląt może powodować zapalenie ogólnoustrojowe, a w konsekwencji śmierć. U kur niosek w wyniku układu rozrodczego dochodzi do pionowej transmisji zarazków, co skutkuje kontaminacją jaj, a w efekcie zakażeniem piskląt (Suzuki 1994). Droga zakażeń pałeczkami *Salmonella* wśród kurcząt jest zarówno pionowa jak i pozioma. Patogeny mogą przenosić się również drogą horyzontalną pomiędzy kurczętami za pośrednictwem odchodów w wyniku oralno-fekalnej drogi zakażenia oraz występujących zanieczyszczeń powietrza, skażonej wody, a nawet gryzoni oraz owadów mogących występować na fermach drobiu (Byrd i in., 1997; Liljebjelke i in., 2005; Thomas i in., 2009; de Vylder i in., 2011; Roll i in., 2011). Patogeny te mają zdolność do przetrwania

nawet na powierzchniach abiotycznych w postaci biofilmu, przez co znacznie zwiększa się czas ich utrzymywania się na fermach drobiu oraz trudności w ich eliminacji (Crump i in., 2002; Jones, 2011)

Największym rezerwuarem pałeczek *Salmonella* Enteritidis na świecie jest hodowla drobiu (Suzuki, 1994; Kimura, 1998; Ward i in., 2000; Antunes i in., 2016). U człowieka najczęściej dochodzi do infekcji poprzez spożycie skażonych jaj i ich przetworów oraz wyrobów z mięsa drobiowego jak i samego mięsa w postaci surowej, bądź po niedostatecznej obróbce termicznej (Bailey, 1988; Bichler i in., 1994; Davies i Wray, 1995; Abdullah, 2010). Około 20% drobiowych produktów żywnościowych zanieczyszczonych jest pałeczkami *Salmonella* (Vestby i in., 2009). Dodatkowo wykazano, że 40% skażonych tusz drobiowych infekowanych jest właśnie przez pałeczki należące do serowaru *S. Enteritidis* (Afshari i in., 2018). Liczba pałeczek *S. Enteritidis*, która może spowodować zakażenie u człowieka, sięga wartości przekraczających 10^6 komórek, jednak u niemowląt, ludzi starszych bądź osób o osłabionej odporności wartość ta jest znacznie niższa i osiąga wartość 10^4 komórek (Chen i in., 2013; Antunes i in., 2016).

Pałeczki *Salmonella* Enteritidis należą do serogrupy D (Thomson i in., 2008). Pałeczki tej serogrupy posiadają na swojej powierzchni antygeny złożone z 3-4 monomerów cukrowych mannozy, ramnozy i galaktozy połączonych z lipidami błonowymi. Antygeny te odpowiadają za interakcje błony komórkowej patogenu z komórkami gospodarza, przez co wpływają na jego wirulencję. W zależności od szczepu pałeczki *S. Enteritidis* posiadają w sumie 12 lub więcej z 17 genów wirulencji występujących głównie w *S. enterica* (*spvB*, *spiA*, *pagC*, *msgA*, *invA*, *sipB*, *prgH*, *spaN*, *orgA*, *tolC*, *ironN*, *sitC*, *IpfC*, *sifA*, *sopB*, i *pefA*), za wyjątkiem genu wirulencji *Salmonella cdtB* (Mezal i in., 2014). Co ciekawe, prawie wszystkie szczepy *S. Enteritidis* posiadają plazmid 38 MDa o wielkości 60 k pz, który jest specyficzny dla serotypu '5a'6, natomiast pozostałe serowary pałeczek *Salmonella* mogą zawierać pokrewne plazmidy, które posiadają te same wspólne regiony wirulencji (Cox, 1995). Na plazmidach zlokalizowane są geny odpowiadające za syntezę fimbrii, które również w znaczny sposób wpływają na przebieg infekcji (Rotger Anglada i Casadesús Pursals, 1999).

Nadzór nad obecnością pałeczek *Salmonella* w żywności w Unii Europejskiej odbywa się przy pomocy rozporządzenia UE 2073/2005 stanowiącego o dopuszczalnych normach mikrobiologicznych wobec tych patogenów obecnych w żywności. Dodatkowo, na podstawie rozporządzenia UE 2160/200317 kraje członkowskie mają obowiązek ustanowić krajowe

programy kontroli pałeczek *Salmonella* (KPK), mające na celu zmniejszenie częstości jej występowania w stadach drobiu.

1.3 Pozajelitowe patogenne *Escherichia coli*

Pozajelitowe patogenne szczepy *Escherichia coli* (ExPEC) to bakterie, które mogą powodować infekcje zlokalizowane poza układem pokarmowym. Odpowiadają za infekcje na całym świecie (Russo i Johnson, 2003; Zhang i Foxman, 2003) powodując u ludzi infekcje dróg moczowych, noworodkowe zapalenie opon mózgowych i posocznicę (Mellata, 2013; Nie i in., 2020). *E. coli* należące do ExPEC dzieli się na uropatogenne *E. coli* (UPEC), *E. coli* związane z zapaleniem opon mózgowych (NMEC) i powodujące sepsę *E. coli* (SEPEC) (Johnson i Russo, 2002, 2005; Russo i Johnson, 2003; Smith i in., 2007). Dodatkowo, do ExPEC należą również patogenne dla drobiu *E. coli* (APEC) (Ewers i in., 2007; Moulin-Schouleur i in., 2007; Johnson i in., 2010; Bélanger i in., 2011; Clermont i in., 2011), patogenne dla ssaków *E. coli* (MPEC) (Shpigel i in., 2008) oraz endometrialne patogenne *E. coli* (EnPEC) (Sheldon i in., 2010). Są grupą patogenów stanowiących zagrożenie głównie przez ich zdolność do horyzontalnego transferu genów, w tym przekazywania czynników wirulencji od innych *Enterobacteriaceae* szczepom komensalnym, (Erjavec i Žgur-Bertok, 2015). ExPEC posiadają czynniki wirulencji, takie jak: *papA papC*, *sfa/foc*, *afa/draBC*, *kpsM II* i *iutA* (Dale i Woodford, 2015), które izolowane są tylko od tej grupy bakterii. Horyzontalny transfer genów wiąże się nie tylko z przekazywaniem czynników wirulencji, ale również z przekazywaniem lekooporności, co stanowi narastający problem (Deborah Chen i Frankel, 2005; Dale i Woodford, 2015).

1.4 Patogenne dla drobiu *Escherichia coli*

Escherichia coli to bakterie gram-ujemne z rodziny *Enterobacteriaceae*, wchodzące w skład mikroflory komensalnej ludzkiego układu pokarmowego. Jednak wiele szczepów powoduje u człowieka biegunkę, a także infekcje dróg moczowych, zapalenie opon mózgowych i biegunkę (Vandemaele i in., 2002). Szacuje się, że około 10-15% bakterii z grupy *coli* w przewodzie pokarmowym ptaków należy do serotypów APEC (z ang. Avian pathogenic *Escherichia coli*- ptasie patogenne *Escherichia coli*) (Saif i in., 2003).

Pałeczki APEC są zdolne do infekcji drobiu w każdym stadium rozwojowym, w hodowlach każdego typu, nie tylko brojlerów, ale też niosek czy wolnego wybiegu (Nolan i in., 2017). Powodują one u zwierząt głównie kolibakteriozę, złożony zespół chorobowy

charakteryzujący się wielonarządowymi zmianami chorobowymi z posocznicą krwotoczną, zespołem obrzęku głowy, chorobą worków powietrznych (przewlekła choroba układu oddechowego), kolibakteriozą weneryczną, zapaleniem tkanki łącznej, zapaleniem otrzewnej, zapaleniem kości i szpiku, zapaleniem błony maziowej, zakażeniem woreczka żółtkowego, zapaleniem jelit, zapaleniem jajowodów, zapaleniem jąder, zapaleniem gardła, kolisepticemią i koligranulomą (choroba Hjarre'a) (Ewers i in., 2003; Saif i in., 2003; Mellata, 2013; Kathayat i in., 2020; Nielsen i in., 2020). U nowo wyklutych kurcząt infekcja *E. coli* może rozpocząć się od zakażenia gardła oraz infekcji pępka i/lub pęcherzyka żółtkowego, z których oba z dużym prawdopodobieństwem kończą się posocznicą (Olsen i in., 2012). Te zmiany chorobowe stanowiły 50% ogólnych zmian związanych ze śmiertelnością w pierwszym tygodniu życia kurcząt (Olsen i in., 2012; Poulsen i in., 2020). Dodatkowo, u 70% kurcząt padłych w niedługim czasie po wykluciu wykryte zostały objawy kolibakteriozy (Kemmett i in., 2014). Wśród wszystkich tusz kurcząt odrzuconych z przyczyn zmian chorobowych aż 43% z nich wykazywało zmiany wskazujące na kolibakteriozę (Saif i in., 2003)

Głównym rezerwuarem pałeczek APEC na fermach drobiu są, oprócz układu pokarmowego kurcząt, ptasie odchody. Najczęstszą pozapokarmową drogą zakażeń ptaków dorosłych jest droga oddechowa i kloakowa (Landman i in., 2013). Do zakażeń drogą oddechową dochodzi najczęściej na skutek niskiej jakości warunków środowiskowych w kurnikach objawiających się wysokim zapyleniem powietrza i dużą zawartością lotnego amoniaku (Nagaraja i in., 1983; Matthijs i in., 2009). Sprzyja to degradacji mechanizmów obronnych nabłonka układu oddechowego kurcząt co prowadzi do infekcji (Guabiraba i Schouler, 2015). Do pozostałych przyczyn infekcji należą m.in. upośledzona bariera skórna lub śluzówkowa, inne infekcje, upośledzony system fagocytozy jednojądrzastej, immunosupresja związana z infekcjami wirusowymi i toksynami (Nolan i in., 2017).

Chorobotwórcze dla drobiu izolaty *E. coli* należą zwykle do serogrup, takich jak O78, O1 i O2 oraz O15 i O55. U drobiu kolibakterioza jest związana ze szczepami *E. coli* serotypów O78:K80, O1:K1 i O2:K1. Szczepy te są jednak pod względem fenotypowym jak i genotypowym niezwykle podobne do szczepów komensalnych (Lutful Kabir, 2010).

Kolibakterioza jest przyczyną strat ekonomicznych hodowców drobiu. Zmniejsza współczynnik wylęgu w przypadku zakażeń embrionów. Zmniejsza również wydajność produkcji jaj poprzez obciążenie infekcją organizmów kur niosek (Lutful Kabir, 2010).

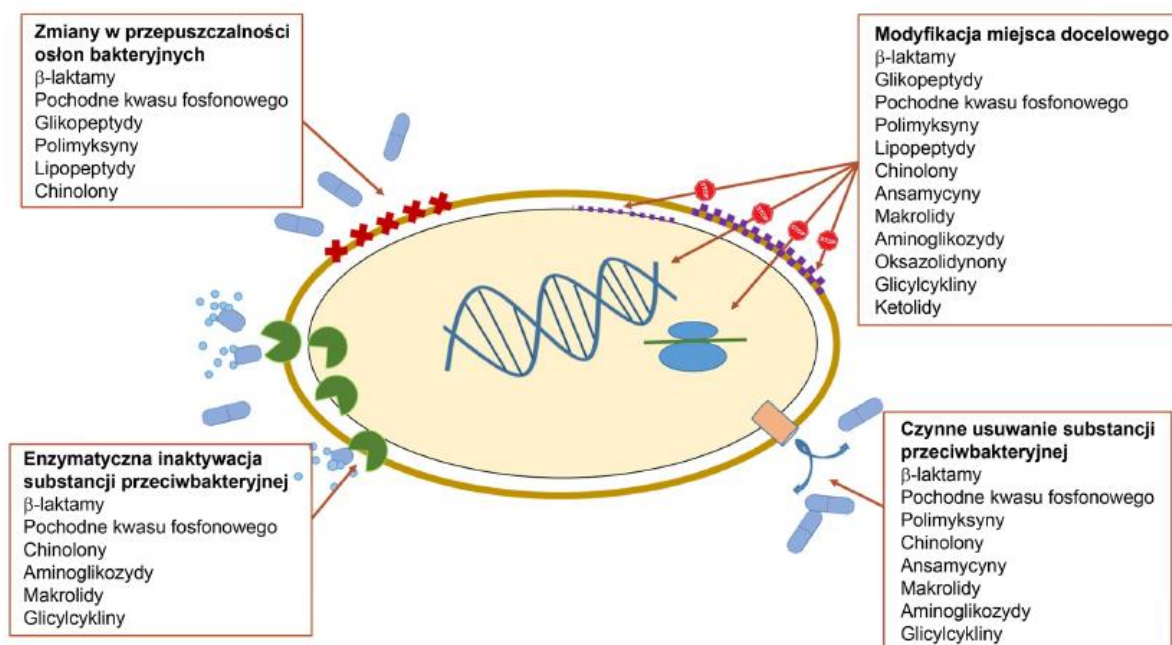
1.5 Problem lekooporności u bakterii izolowanych od drobiu

Lekooporność jest to zdolność mikroorganizmów do przetrwania w środowisku, w którym obecne są środki przeciwdrobnoustrojowe. Zdolność ta znacznie utrudnia eradykację ze środowiska przemysłu produkcji mięsa drobiowego i jaj patogenów drobiu oraz człowieka, poprzez brak skuteczności powszechnie w tym celu stosowanych chemioterapeutyków (Chapman i Johnson, 2002; McEwen i Fedorka-Cray, 2002; Diarra i Malouin, 2014). Lekooporność nabywana jest przez drobnoustroje zarówno na drodze doboru naturalnego w wyniku nadużywania przez producentów jaj i mięsa drobiowego chemioterapeutyków, w wyniku czego są one nieustannie obecne w środowisku, bądź na drodze horyzontalnej wymiany genów. Geny lekooporności u patogenów drobiu pochodzą z różnych rezerwuarów, m.in. odchodów zwierząt (Colomer-Lluch i in., 2011), ściółki na fermach drobiu (Sridevi Dhanarani i in., 2009; Furtula i in., 2013) czy gleby (Van Goethem i in., 2018). Obecnie już ponad 70% szczepów bakterii wykrytych w przemyśle drobiarskim wykazuje oporność na przynajmniej jeden z stosowanych przez człowieka chemioterapeutyków (World Health Organization (WHO); Urban-Chmiel i in., 2022). Jest to przyczyną znacznego spadku stosowania przez hodowców zwierząt chemioterapeutyków, który odnotowano w ciągu ostatniej dekady (U.S. Food and Drug Administration; Sneeringer i in., 2017). Mimo to wraz z rozwojem tej branży przemysłu, ciągle wzrasta ogólna liczba stosowanych przez producentów środków przeciwdrobnoustrojowych (Samad, 2022).

1.6 Lekooporność pałeczek *Salmonella*

Pierwszy przypadek oporności pałeczek *Salmonella* na chemioterapeutyki odnotowano w latach 60 ubiegłego wieku, gdzie wykryto szczep oporny na działanie chloramfenikolu (Montville i Matthews, 2014). Od tamtej pory izolowano wiele szczepów tego patogenu wykazujących odporność na chemioterapeutyki (Yoke-Kqueen i in., 2008). Pałeczki *Salmonella* mogą nabyć lekooporność nie tylko poprzez dobór naturalny w środowisku, w którym obecne są chemioterapeutyki (Hyeon i in., 2011), ale również na drodze horyzontalnego transferu genów (Heuer i in., 2008). Mechanizm lub mechanizmy takiej odporności różni się w zależności od środka przeciwdrobnoustrojowego (Obraz 1). Jednym z najczęściej występujących mechanizmów lekooporności jest inaktywacja cząstek chemioterapeutyku poprzez ich enzymatyczną przemianę do postaci nieaktywnej biologicznie. Drobnoustroje mogą również zmodyfikować miejsca docelowego działania chemioterapeutyku w celu uniemożliwienia jego działania jako inhibitora, np. zmodyfikowanie cząstek enzymu

topoizomerazy uniemożliwia przyłączenie się do niego cząsteczki chinolonu co zapobiega inaktywacji tego enzymu. Kolejnym mechanizmem wykorzystywanym przez drobnoustroje jest aktywne wypompowywanie cząstek chemioterapeutyku z wnętrza komórki, z wykorzystaniem pomp effluksowych. Z drugiej strony drobnoustroje zamiast w sposób czynny pozbywać się chemioterapeutyku z wnętrza komórki mogą zmodyfikować błonę komórkową zmniejszając jej przepuszczalność dla chemioterapeutyków, nie dopuszczając do wniknięcia jego cząstek do wnętrza komórki. (Willey i Van Der Donk, 2007; Munita i Arias, 2016; Skarżyńska i in., 2020). Ciągłe poszerzanie się zjawiska lekooporności pałeczek *Salmonella* oraz jego różnorodność stwarza konieczność opracowania metod zwalczania tych patogenów.



Obraz 1. Mechanizmy lekooporności w zależności od środka przeciwdrobnoustrojowego (Skarżyńska i in., 2020)

1.7 Lekooporność patogennych dla drobiu *Escherichia coli*

W przypadku patogennych dla drobiu *Escherichia coli* lekooporność stanowi narastający problem, ponieważ wśród tych patogenów izolowanych na fermach drobiu na całym świecie 97% posiada oporność na przynajmniej 1 chemioterapeutyk, a 40% z nich odporna jest na przynajmniej 3 takie środki (Subedi i in., 2018; Levy i in., 2020; Johar i in.,

2021). Dodatkowo, około 10% z nich nie wykazuje wrażliwości na działanie kolistyny, tzw. chemioterapeutyku ostatniej szansy (Ievy i in., 2020). Stanowi to olbrzymie zagrożenie dla zdrowia człowieka w przypadku kontaktu z ludzką mikroflorą jelitową ze względu na zdolność tych szczepów do przekazywania genów odporności na chemioterapeutyki innym drobnoustrojom (rozdz. 1.3). W przypadku kontaktu z innymi drobnoustrojami zdolnymi przyjąć od APEC geny na drodze horyzontalnej transmisji, przy takiej skali zjawiska odporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, niemal pewne jest przekazanie lekooporności, w tym również szczepom patogennym, co znacznie utrudnia skuteczne leczenie przy pomocy chemioterapeutyków (Johnson i in., 2010). Zmusza to do wykorzystania alternatywnych metod zwalczania drobnoustrojów, jakimi są bakteriofagi.

Ze względu na wysoki poziom oporności na chemioterapeutyki u APEC Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności EFSA w Ocenie Wykazu i Kategoryzacji Chorób Zwierząt umieścił patogenne dla drobiu *Escherichia coli* na liście patogenów opornych na środki przeciwdrobnoustrojowe (rozporządzenie UE nr 2016/429). Zagrożenie powodowane przez APEC zostało ocenione zgodnie z kryteriami Ustawy o zdrowiu zwierząt (AHL), w szczególności z kryteriami art. 7 dotyczącymi profilu choroby i wpływu, art. zasady kontroli, w art. 9 i art. 8, dotyczących wykazu gatunków drobnoustrojów spokrewnionych z bakterią (EFSA AHAW 2022).

1.8 Bakteriofagi

Bakteriofagi, to byty biologiczne zdolne do infekcji i namnażania wyłącznie w organizmach bakterii. Poprzez specyficzną budowę białkowej otoczki materiału genetycznego są zdolne do infekcji pojedynczych gatunków, a nawet szczepów bakterii, przez co są określane jako wirusy o wysokiej specyficzności działania. Bakteriofagi, jak wszystkie wirusy, należą do pasożytów absolutnych. Nie posiadają żadnych organelli niezbędnych do prowadzenia procesów metabolicznych takich jak wytwarzanie energii czy synteza białek bądź kwasów nukleinowych. Ich namnażanie jest w zupełności zależne od komórek gospodarza. Zazwyczaj posiadają bardzo wysoką specyficzność działania poprzez zdolność do infekcji wyłącznie jednego gatunku bądź szczepu mikroorganizmów.

Bakteriofagi są najczęściej występującymi cząstkami biotycznymi na Ziemi, szacuje się, że ich liczba na naszej planecie przekracza 10^{31} (Comeau i Krisch, 2005). Są one obecne wszędzie tam, gdzie występują komórki bakterii gospodarza niezbędne im do namnażania,

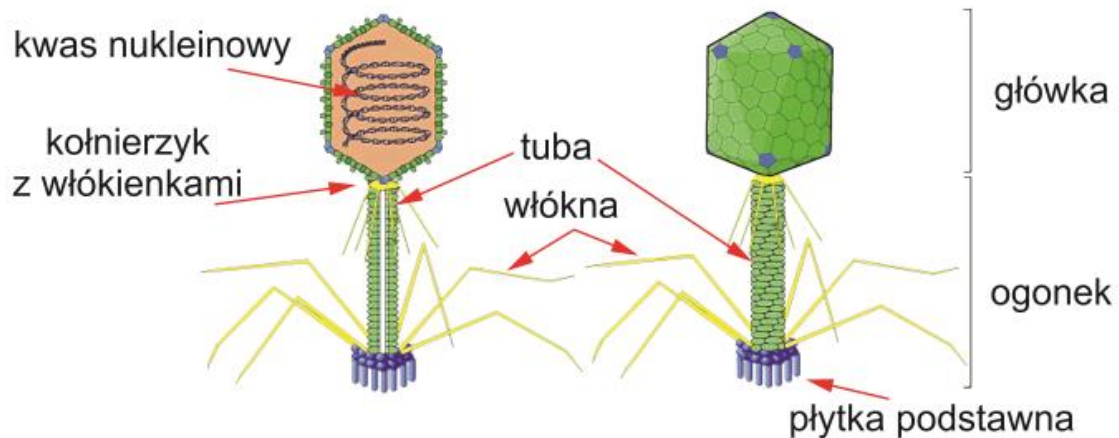
m.in. w ściekach i fekaljach, glebie, w zbiornikach wodnych oraz wewnątrz układu pokarmowego organizmów wyższych. (Kutter i Sulakvelidze, 2004). Gęstość ich populacji jest wprost proporcjonalna do populacji bakterii. Stanowią swoisty naturalny regulator ich liczebności, niszcząc nadmiar komórek bakteryjnych w środowisku, dzięki czemu możliwe jest zachowanie równowagi ekologicznej (Díaz-Muñoz i Koskella, 2014).

Bakteriofagi potrafią zachować swoje właściwości do infekcji nawet przez 40 lat (Cłokie i in., 2011), wykazują jednak wrażliwość na niektóre czynniki środowiskowe, takie jak promieniowanie UV, pH w zakresie poniżej 3 i powyżej 12, kwas askorbinowy, alkohole, mocznik, środki powierzchniowo czynne czy temperatura powyżej 50°C (Adams, 1959; Kutter i Sulakvelidze, 2004).

1.9 Historia badań nad bakteriofagami

Bakteriofagi odkrył w 1896 roku Ernest Hankin, który zaobserwował, że wody Gangesu posiadają właściwości bakteriobójcze. Jednak dopiero w roku 1915 bakteriolog Frederick Twort wysunął hipotezę, że tym czynnikiem może być wirus. Potwierdził ją w roku 1917 Felix d'Hérelle, który wyizolował bakteriofagi i wykorzystał je jako lek przeciwko czerwoncem bakteryjnej u dzieci (Weinbauer i Rassoulzadegan, 2003). Jest on również autorem nazwy „bakteriofag”. Bakteriofagi bardzo szybko zyskały zainteresowanie środowiska naukowego jako potencjalne narzędzie przeciwko mikroorganizmom chorobotwórczym i były stosowane jako terapie w latach trzydziestych i czterdziestych XX wieku, jednak odkrycie przez Fleminga chemioterapeutyków sprawiło, że po drugiej wojnie światowej badania nad fagoterapią kontynuowano jedynie w krajach Europy Wschodniej i w Związku Radzieckim. Obecnie, poprzez znaczne zwiększenie oporności mikroorganizmów na działanie chemioterapeutyków zainteresowanie bakteriofagami przez środowisko naukowe nieustannie wzrasta.

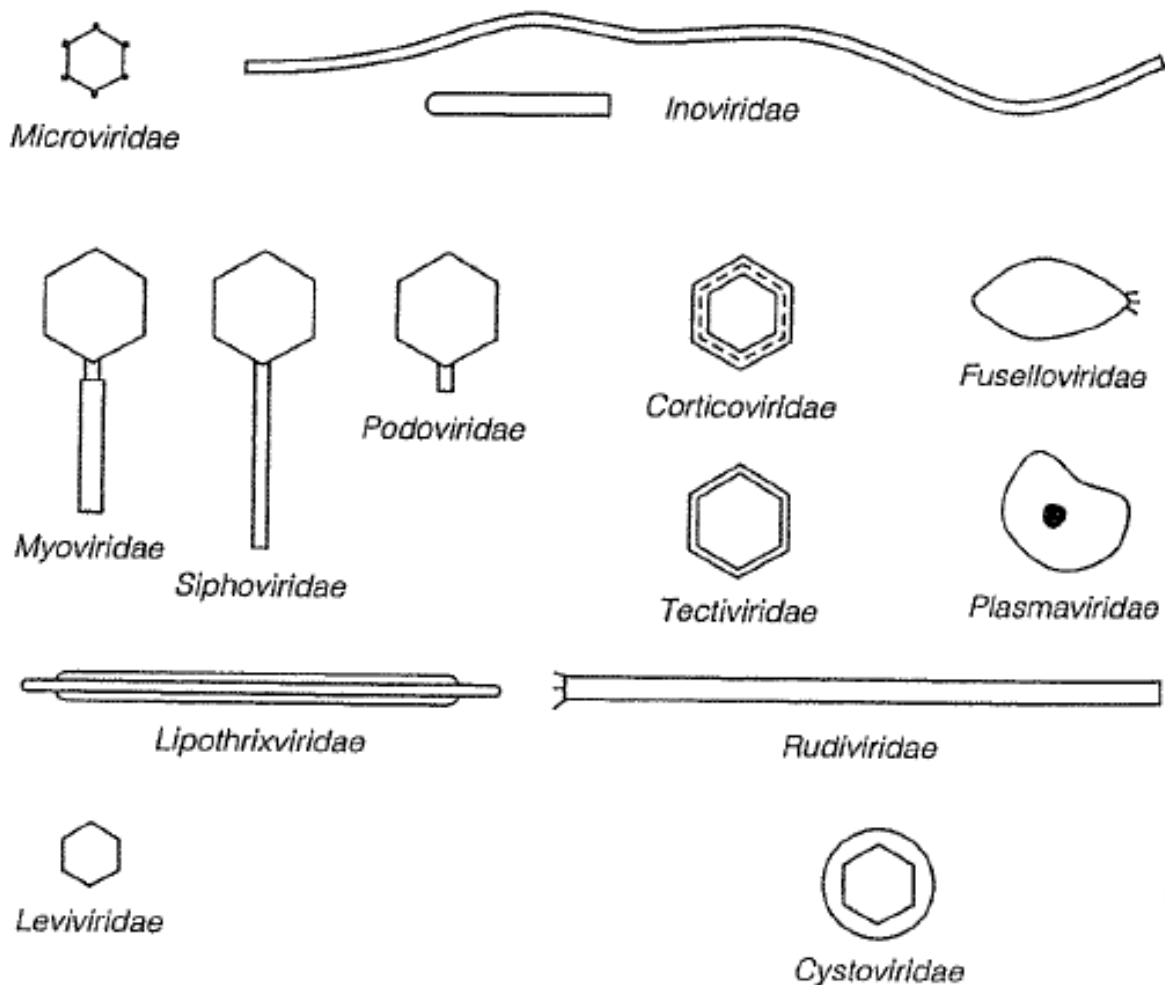
1.10 Budowa bakteriofagów



Obraz 2. Budowa bakteriofagów (Bakteriofagi - dobroczynne wirusy - IKiFP PAN)

Bakteriofagi zbudowane są z dwóch głównych składowych, z materiału genetycznego w postaci jedno bądź dwuniciowego DNA lub RNA posiadającego formę liniową bądź kulistą. Rozmiar materiału genetycznego bakteriofagów waha się od 3,5 par zasad (pz) u bakteriofaga *bz12* specyficznego wobec *E. coli* do 670 pz u faga G, dla którego gospodarzem jest *Bacillus megaterium* (Sun i Serwer, 1997; Friedman i in., 2009). Materiał genetyczny koduje jedynie informacje potrzebne do replikacji wirusa w komórce gospodarza. t.j. synteza białek kapsydu oraz enzymów niezbędnych do powielenia genomu wirusa, opakowanie go kapsydem i wydostanie się utworzonych wirionów poza komórkę i ponowienie procesu infekcji. Kwasy nukleinowe bakteriofaga otoczone są kapsydem zbudowanym z białka bądź białka oraz lipidów (Ackermann i Prangishvili, 2012).

Wśród bakteriofagów występuje znaczna różnorodność form kapsydu, m.in. wieloboczna, sferyczna czy wrzecionowata, jednak dominującą są wiriony, do których przyczepiony jest ogonek umożliwiający adsorpcję do komórki gospodarza i wprowadzenie materiału genetycznego, fagi o tej budowie stanowią ponad 95% całej liczby bakteriofagów opisanych w literaturze (Kutter i Sulakvelidze, 2004; Ackermann i Prangishvili, 2012).

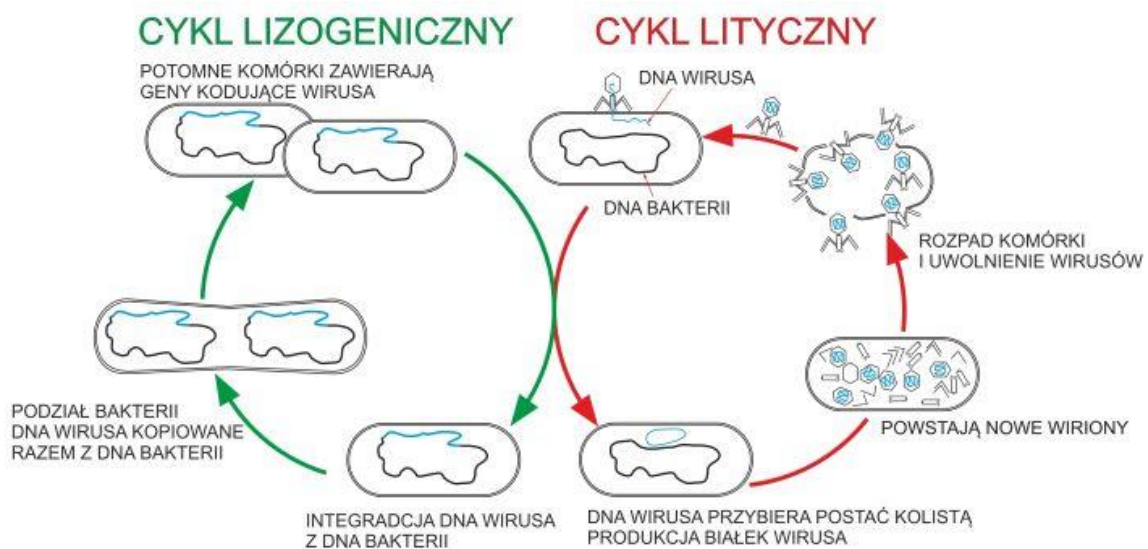


Obraz 3. Klasyfikacja bakteriofagów na podstawie morfologii (Baji i Markiewicz, 2006).

Według najnowszej klasyfikacji taksonomicznej bakteriofagów zostały one zgrupowane w 11 rzędach: *Belfryvirales*, *Caudovirales*, *Halopalevirales*, *Haloruvirales*, *Kalamavirales*, *Levivirales*, *Ligamenvirales*, *Mindivirales*, *Petivirales*, *Tubulavirales*, *Vinavirales* (Current ICTV Taxonomy Release | ICTV). Najliczniejszym z nich jest rząd *Caudovirales*, któremu przypisuje się 96% wszystkich znanych bakteriofagów. Zawiera on również 30% wszystkich znanych nauce wirusów bakteryjnych. Charakteryzują się one materiałem genetycznym w postaci dwuniciowego DNA oraz obecnością ogonka kapsydu (Current ICTV Taxonomy Release | ICTV; Ackermann, 1987, 2007). Dotychczas zidentyfikowano 2814 gatunków bakteriofagów należących do tego rzędu pogrupowanych w 14 rodzin: *Ackermannviridae*, *Autographiviridae*, *Chaseviridae*, *Demerecviridae*, *Drexelviriidae*, *Guelinviridae*, *Herelleviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Rountreeviridae*, *Salasmaviridae*, *Schitoviridae*, *Siphoviridae*, *Zobellvirida*, *Lilyvirus* (Current ICTV Taxonomy Release | ICTV). Bakteriofagi należące do poszczególnych rodzin w ramach rzędu

Caudovirales różnią się od siebie pod względem budowy kapsydu. Najliczniej z nich reprezentowana jest rodzina *Siphoviridae*, do których należy ponad 60% znanych fagów. Cechą charakterystyczną bakteriofagów z tej rodziny jest długi, niekurczliwy ogonek. Najbardziej znany przedstawiciel tej rodziny to bakteriofag λ (Dion i in., 2020). Fagi należące do rodziny *Myoviridae* posiadają krótszy, lecz kurczliwy ogonek, natomiast przedstawiciele rodziny *Podoviridae*, najmniejszej z przedstawionych rodzin reprezentowanej przez ok 14% bakteriofagów, mają jeszcze krótszy, lecz niekurczliwy ogonek. Bakteriofagi z rodziny *Tectiviridae* nie posiadają typowego ogonka, jednak w momencie adsorpcji do komórki gospodarza odkształcają jego błonę tworząc strukturę przypominającą ogonek występujący u innych bakteriofagów (van Regenmortel i in., 2013). Przedstawiciele rodziny *Plasmaviridae* nie posiadają białkowego kapsydu, a jedynie otoczkę lipidową.

1.11 Cykle replikacyjne bakteriofagów



Obraz 4. Cykle replikacyjne bakteriofagów (Bakteriofagi - dobroczynne wirusy - IKiFP PAN)

Pierwszym etapem procesu replikacji pojedynczego bakteriofaga jest infekcja komórki bakterii gospodarza zaczynająca się nieodwracalną adsorpcją do jej ściany komórkowej. Adsorpcja bakteriofagów do powierzchni komórki bakteryjnej jest nieodwracalna nawet jeśli komórka ta jest uszkodzona lub martwa (Abedon, 1990). W tym procesie, wyspecjalizowane w tym celu struktury bakteriofaga takie jak włókna ogonka czy kolce, które wiążą się z molekułami specyficznymi obecnymi na powierzchni komórki gospodarza, zwane receptorami. Mogą to być niemal wszystkie struktury obecne na powierzchni komórki takie jak

białka, lipopolisacharydy, kwasy teichojowe a nawet wici bakterii czy fimbrie, które stanowią pusty w środku kanał komórkowy, umożliwiającą wnikanie materiału genetycznego faga (Lindberg, 1973).

Następnie za pomocą enzymów, takich jak depolimerazy polisacharydowe czy liazy, obecnych w płycie podstawowej ogonka bakteriofaga powstaje otwór w ścianie komórkowej bakterii, przez który wstrzykiwany jest materiał genetyczny bakteriofaga. Kapsyd wirionu pozostaje nadal związany do powierzchni komórki gospodarza. W celu uniknięcia lizy przez enzymy znajdujące się w komórce gospodarza materiał genetyczny bakteriofaga często ulega bardzo szybkiej cyrkularyzacji (Kutter i Sulakvelidze, 2004).

Od tego momentu proces infekcji może przebiegać na dwa sposoby. Fagi zwane wirulentnymi będą przeprowadzać dalsze etapy namnażania w cyklu litycznym, natomiast bakteriofagi nazywane łagodnymi lub niejadliwymi przeprowadzają ten proces w cyklu lizogenicznym (Chibani-Chennoufi i in., 2004).

W cyklu litycznym następuje synteza białek odpowiedzialnych za replikację materiału genetycznego faga oraz regulację jego transkrypcji. Następnie genom wirusa jest replikowany i syntezowane są białka strukturalne kapsydu. Gdy komórka gospodarza wytworzy już wszystkie elementy nowego wirionu następuje zamknięcie fagowych kwasów nukleinowych w kapsydzie za sprawą enzymów. Gdy w komórce gospodarza zostanie wytworzona odpowiednia ilość cząstek wirusa, przy użyciu enzymów litycznych (endolizyn) rozcinających peptydoglikan budujący ścianę komórkową bakterii oraz holin tworzących otwory w błonie komórkowej, następuje rozpad komórki gospodarza i uwolnienie cząstek bakteriofaga do środowiska zewnętrznego w celu zainfekowania kolejnych komórek bakterii gospodarza (Kutter i Sulakvelidze, 2004). Bakteriofagi charakteryzujące się litycznym cyklem namnażania wykorzystywane są w terapii bakteriofagowej ze względu na natychmiastową indukcję namnażania wirionów a tym samym szybką lizę komórki gospodarza. W cyklu lizogenicznym materiał genetyczny wirusa obecny w komórce gospodarza nie indukuje namnażania się wirionów niezwłocznie po penetracji komórki gospodarza. Wbudowuje się on w genom gospodarza bądź pozostaje w stanie podobnym do plazmidu i jest kopiowany do komórek potomnych wraz z podziałem komórkowym bakterii. Ta forma materiału genetycznego nazywana jest profagiem i może trwać w komórce przez wiele generacji. Gdy w środowisku pojawi się czynnik indukujący stres komórkowy, np. promieniowanie UV bądź obecność toksycznie działających czynników chemicznych profag może przejść w lityczny cykl namnażania (Salmond i Fineran, 2015).

Oprócz cyklu litycznego i lizogenicznego występują również formy pośrednie. Pseudolizogenezę można zdefiniować jako etap zahamowania rozwoju bakteriofaga w komórce gospodarza bez namnażania genomu faga (jak w rozwoju litycznym) lub jego replikacji zsynchronizowanej z cyklem komórkowym i stabilnego utrzymania w linii komórkowej (jak w lizogenizacji), który przebiega bez degradacji genomu wirusa, umożliwiając w ten sposób późniejsze ponowne uruchomienie rozwoju wirusa. Zjawisko to jest zwykle powodowane przez niekorzystne warunki wzrostu dla komórki gospodarza i kończy się wraz z rozpoczęciem prawdziwej lizogenizacji lub wzrostu litycznego, gdy warunki wzrostu ulegają poprawie. Pseudolizogeneza wydaje się odgrywać ważną rolę w przeżywalności fagów, ponieważ bakterie w środowisku naturalnym mogą mieć ograniczony dostęp do składników pożywienia lub ich wzrost jest bardzo powolny. Zjawisko to może być ważnym aspektem śmiertelności bakterii zależnej od fagów i może wpływać na wirulencję niektórych szczepów bakteryjnych (Łoś i Węgrzyn, 2012).

Cyklem namnażania charakterystycznym dla bakteriofagów o wrzecionowatej budowie kapsydu jest wydzielanie wirionów bez niszczenia komórek gospodarza. Bakteriofagi te namnażane są episomalnie jak plazmidy, wyłączając mechanizm wbudowania materiału genetycznego wirusa do genomu gospodarza bądź mogą być zintegrowane chromosomalnie, z wymaganą indukcją do rozpoczęcia replikacji episomalnej (Rakonjac i in., 2011).

1.12 Terapia fagowa

W dobie rosnącej lekooporności drobnoustrojów powraca zainteresowanie zastosowaniem bakteriofagów w zwalczaniu bakterii patogennych. Po odkryciu bakteriofagów (rozdz. 1.9) wykazywano wielkie zainteresowanie stosowaniem wirusów bakteryjnych w zwalczaniu chorób, jednak rozpowszechnienie stosowania chemioterapeutyków po II wojnie światowej skierowało uwagę świata naukowego w stronę chemicznych i roślinnych czynników o działaniu terapeutycznym (Summers, 2003; Fernando i in., 2020). Pierwsze zastosowanie fagów na ludziach udokumentowano w niedługim czasie od ich odkrycia, już w latach 30 XX wieku (Summers, 2003; Fernando i in., 2020). Od około 90 lat w sposób bezpieczny stosowano terapię fagową u ludzi przeciwko bakteriom z rodzajów *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus* i *Pseudomonas* bez odnotowanych groźnych dla zdrowia skutków ubocznych (Kutter i Sulakvelidze, 2004). Co ciekawe, jednym najlepiej rozpoznawanych ośrodków eksperymentalnego stosowania terapii fagowej w Europie jest Instytut Immunologii i Terapii Eksperymentalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, gdzie w latach 50 ubiegłego

wieku używano bakteriofagów spersonalizowanych względem leczenia danego pacjenta. Uzyskano w ten sposób skuteczność leczenia przekraczającą 75% (Abedon i in., 2011). Terapię fagową u ludzi stosuje się głównie w przypadkach, gdzie niemożliwe jest zastosowanie chemioterapeutyków z powodu braku wrażliwości czynnika infekcyjnego na chemioterapeutyki, alergii, słabego krążenia przy zapaleniu szpiku i owrzodzeniach cukrzycowych lub tworzeniu się biofilmu (Abedon i in., 2011). Bakteriofagi są stosowane nie tylko w leczeniu ludzi, ale również zwierząt. Jednak aplikacyjne stosowanie bakteriofagów w przemyśle żywnościowym odnotowało znaczny wzrost dopiero w ciągu ostatnich kilki dekad ((Park i in., 2007; Endersen i in., 2014; Górski i in., 2018).

Terapię fagową u zwierząt stosowano do tej pory w różnych formach. Aplikowano je zwierzętom w formie dodatku do karmy (Lim i in., 2012; Adhikari i in., 2017) lub wody pitnej (Clavijo i in., 2019; Vaz i in., 2020), jako spray w aerozolu (Borie i in., 2008, 2009), bądź poprzez bezpośrednie podanie doustne (Atterbury i in., 2007; Bardina i in., 2012).

1.13 Zastosowanie bakteriofagów u drobiu

Wirusy bakteryjne ze znaczną skutecznością stosowano w zwalczaniu patogenów u drobiu. Z sukcesem stosowano je w walce z takimi patogenami jak pałeczki *Salmonella* Typhimurium (Bardina i in., 2012), *Campylobacter jejuni* (Wagenaar i in., 2006; El-Shibiny i in., 2007), *Campylobacter coli* (El-Shibiny i in., 2007) czy *Listeria monocytogenes* (Endersen i in., 2014). Również pałeczki *Salmonella* Enteritidis, szczerp stanowiący największe zagrożenie dla zdrowia ludzkiego, obecne u drobiu hodowlanego były w wielu przypadkach zredukowane o ponad 90% zmniejszając w znaczący sposób również śmiertelność kurcząt. Adhikari i in. (2017) analizując skuteczność bakteriofagów wobec pałeczek *Salmonella* kolonizujących narządy wewnętrzne kur niosek wykazali redukcję liczby tych patogenów o 0,9 log₁₀ jtk/g. Zaobserwowano redukcję pałeczek *Salmonella* w narządach wewnętrznych ptaków o kolejno 72.7% i 75.7% po podaniu zawiesiny zawierającego pojedynczego bakteriofaga (Borie i in., 2008), bądź mieszaninę 3 bakteriofagów (Borie i in., 2009) w formie areozolu. Sklar i in. (2001) osiągnęli redukcję tych patogenów o wartości ok 2 log₁₀ jtk/g, istnieją jednak doniesienia literaturowe o wyższej skuteczności bakteriofagów sięgającej 4.2 log₁₀ jtk/g (Atterbury i in., 2007), 3.5 log₁₀ jtk/g (Fiorentin i in., 2005) czy nawet 6 log₁₀ jtk/g (Andreatti Filho i in., 2007). Z podobną skutecznością co pałeczki *Salmonella* zredukowano liczbę obecnych u kurcząt *Escherichia coli* co znacznie zmniejszyło bądź całkowicie eliminowało odsetek padłych ptaków. Huff i in. (2003) zaobserwowali zmniejszenie śmiertelności kurcząt z 53% do 17%

przy zastosowaniu zawiesiny bakteriofagów wobec kurcząt posiadających objawy kolibakteriozy. Rok później ten zespół naukowców opisał skuteczne zastosowanie bakteriofagów w prewencji zakażeń bakteriami *E. coli* redukując śmiertelność kurcząt z 20% do 3% w przypadku ciągłego stosowania zawiesiny bakteriofagów (Huff i in., 2004). W przypadku zespołu Oliveira i in. (2010) współczynnik śmiertelności kurcząt został zmniejszony aż do wartości 0,5%. W przypadku obydwu patogenów ich eliminacja odbywała się bez uszczerbku na zdrowiu zwierząt.

1.14 Biofilm bakteryjny

Bakterie w trakcie cyklu życiowego narażone są na nieprzyjazne warunki środowiska, takie jak zmienna ilość dostępnego pokarmu, promieniowanie UV, obniżenie wilgotności środowiska czy obecność środków przeciwdrobnoustrojowych. W celu zwiększenia odporności na te warunki drobnoustroje wykształciły formę osiadłą, zwaną biofilmem. Biofilm zdefiniowano jako osiadłe konsorcjum bakterii przytwierdzonych do powierzchni ciała stałego i otoczonych macierzą pozakomórkową zawierającą pozakomórkowe polisacharydy (EPS), DNA (eDNA), białka, fosfolipidy, kwasy tejchojowe oraz fakultatywnie elementy nieorganiczne takie jak kryształy minerałów, cząstki rdzy, glina, muł oraz składniki krwi. Zawartość składników macierzy zależy nie tylko od środowiska utworzenia biofilmu ale również drobnoustrojów, które biofilm wytwarza (Mulcahy i in., 2008; Landini i in., 2010; Das i in., 2013). Drobnoustroje posiadają zdolność do tworzenia biofilmu nie tylko na powierzchniach abiotycznych, ale również na powierzchni organizmów wyższych. Patogeny bytujące wewnątrz takich organizmów są szczególnie narażone na niekorzystne czynniki środowiska, dlatego w drodze ewolucji wytworzyły skuteczne sposoby opierania się niekorzystnym warunkom, z których jednym z najważniejszych jest tworzenie biofilmu.

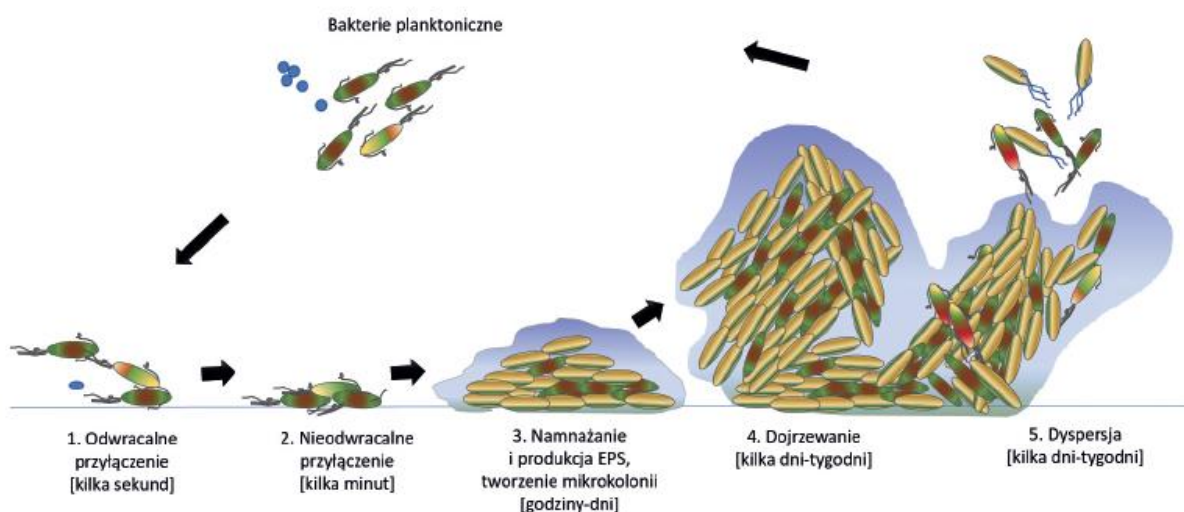
1.15 Historia badań nad biofilmem

Pierwsze oficjalne badania nad biofilmem przeprowadził w 1708 roku Antonie van Leeuwenhoek, który badał tkanki zwierzęce skolonizowane przez bakterie oraz zdrapany biofilm obecny na powierzchni jego własnych zębów za pomocą mikroskopu optycznego. Termin „biofilm” został określony dopiero w roku 1985 przez Billa Costertona. W 2002 r. wraz z Donlanem przedstawili pierwszy istotny dla świata naukowego opis biofilmu, określony jako „osiadłe zbiorowiska pochodzące od drobnoustrojów, charakteryzujące się komórkami, które

są nieodwracalnie związane z podłożem lub powierzchnią styku lub ze sobą nawzajem, osadzone w matrycy zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych, które wytworzyły, i wykazują zmieniony fenotyp w odniesieniu do tempa wzrostu i transkrypcji genów” (Costerton i in., 1999). Największy postęp w badaniach nad składem biofilmu, jego wzrostem oraz eradykacją i ograniczaniem jego rozprzestrzeniania się nastąpił dopiero w ciągu ostatnich dwóch dekad. (Hall-Stoodley i in., 2004; Römling i Balsalobre, 2012; Pearce i in., 2019).

1.16 Tworzenie biofilmu

Zdolność do wytwarzania biofilmu została potwierdzona u większości bakterii patogennych, m.in. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* czy *Enterobacter cloacae* i *Campylobacter* sp. (Bower i Daeschel, 1999; Stepanovic i in., 2004; Gunduz i Tuncel, 2006; Kalmokoff i in., 2006; Rode i in., 2007; Nickerson i in., 2017). Zdolność wytwarzania biofilmu nie jest zawężona jedynie do bakterii, posiadają ją również niektóre gatunki drożdży oraz grzybów strzępkowych, z rodzajów *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Coccidioides* i *Pneumocytis* (Reynolds i Fink, 2001; Loussert i in., 2010; Fanning i Mitchell, 2012; Leonhard i in., 2013; Sun i in., 2015).



Obraz 5. Cykl życiowy biofilmu (Ławniczek-Wałczyk i Górny, 2022)

Proces tworzenia biofilmu składa się z kilku etapów (Obraz 5). W pierwszym z nich jest etap adsorpcji. Mikroorganizmy planktoniczne przylegają do powierzchni ciała stałego tworząc

mikrokolonie powierzchniowe. Następnie zaczyna się proces produkcji macierzy pozakomórkowej, składającej się głównie z polisacharydów, którym opłaszczają się drobnoustroje. Kolejnym etapem jest dojrzewanie biofilmu, podczas którego następuje intensywny podział komórkowy oraz wytwarzanie dużej ilości EPS, w tym czasie zachodzi również horyzontalny transfer genów. W ostatnim etapie zachodzi niszczenie struktury biofilmu i uwolnienie komórek w formie planktonicznej do środowiska w celu zakładania kolejnych biofilmów (Svensson i in., 2014). Etap dyspersji biofilmu zachodzi naturalnie poprzez mechaniczną bądź chemiczną destrukcję macierzy pozakomórkowej indukowaną egzogenicznie bądź endogenicznie jako mechanizm ucieczki mikroorganizmów od warunków niedoboru składników odżywczych bądź innych niedogodności występujących wewnątrz biofilmu (Hunt i in., 2003, 2004; Sauer i in., 2004), takich jak zmiana stężenia tlenu (Thormann i in., 2005), wzrostu poziomu tlenu azotu (Barraud i in., 2006; Zhu i in., 2018), czy obecności bądź wpływu środków przeciwdrobnoustrojowych (Saxena i in., 2019).

Regulacja procesu tworzenia biofilmu różni się między mikroorganizmami. Zależy ona od wielu czynników środowiskowych i genetycznych, takich jak grubość ściany komórkowej bakterii, dostępności składników odżywczych, siły jonowej środowiska, a nawet obecności środków przeciwdrobnoustrojowych już w stężeniach, w których nie wykazują one działania przeciwdrobnoustrojowego (Anderson i O'Toole, 2008; Landini i in., 2010; Hall i Mah, 2017). Biofilm bakterii nie tylko przedstawia odmienny od form planktonicznych fenotyp (Donlan, 2001) ale również posiada odmienny profil ekspresji genów, co wskazuje, że synteza niektórych białek może być kluczowa dla wytworzenia przez mikroorganizmy biofilmu i procesu jego dojrzewania (Reeser i in., 2007).

Bakterie występujące w biofilmie wykazują znaczną odporność na wysuszenie, tolerancję wysokie temperatury oraz pH środowiska poniżej 3 (Siringan i in., 2011), chroni drobnoustroje beztlenowe przed niekorzystnym działaniem tlenu (Reuter i in., 2010) i zwiększa nawet 1000x tolerancję na chemioterapeutyki (Mulcahy i in., 2008; Thomas i in., 2009). Dodatkowo, niewielkie odległości między komórkami oraz obecność eDNA powodują znaczny wzrost horyzontalnego transferu genów, przez co zwiększa się liczba genów drobnoustrojów obecnych w biofilmie zwiększając ich przeżywalność zarówno w formie biofilmu jak i po uwolnieniu form planktonicznych. Zjawisko to zachodzi ze szczególną intensywnością w przypadku biofilmów wielogatunkowych, które stanowią większość przypadków tych form (Watnick i Kolter, 2000). Wymienione cechy biofilmu sprawiają, że jest to forma bardziej powszechna od planktonicznych form drobnoustrojów (Hunt i in., 2003; Liu i in., 2019).

Przejście z planktonicznego typu wzrostu bakterii do form biofilmu jest procesem ściśle regulowanym przez aktywność genów bakteryjnych, które odpowiadają za syntezę białek niezbędnych do wytworzenia i późniejszego dojrzewania biofilmu (Reeser i in., 2007). Przyczynami zmiany formy bakterii z formy planktonicznej na biofilm mogą być czynniki zarówno genetyczne, jak i środowiskowe, takie jak dostępność składników odżywczych, pH środowiska, stres komórkowy, grubość ściany komórkowej bakterii czy nawet obecność w środowisku chemioterapeutyków w stężeniu subinhibitorowym (Reeser i in., 2007; Anderson i O'Toole, 2008; Landini i in., 2010; Hall i Mah, 2017).

1.17 Występowanie biofilmów

Biofilm jest formą wzrostu bakterii niezwykle rozpowszechnioną w środowisku naturalnym. Jednym z najlepiej poznanych biofilmów jest płytką nazębna (Costerton i in., 1999). Niemal w każdym środowisku, gdzie występują warunki do wzrostu drobnoustrojów oraz obecna jest powierzchnia ciała stałego można znaleźć biofilm (Donlan, 2001). Biofilm bakterii obecny jest na różnorodnych powierzchniach zarówno biotycznych jak i abiotycznych. Biofilm występuje na tkankach zarówno żywych jak i martwych organizmów. Wykryto go w środowiskach morskich na powierzchniach alg, roślin, zooplanktonu, skorupiaków, a nawet owadów (Colwell i Hill, 1995; Huq i in., 2008; Townsley i Shank, 2017; Ahmed i in., 2018). Jest obecny w przemysłowych systemach wodnych m.in. na powierzchni rur i zbiorników (Donlan, 2001), porasta powierzchnię maszyn przemysłu przetwórstwa żywności (Marchand i in., 2012) oraz narzędzi i urządzeń wykorzystywanych w branży medycznej, szczególnie na endoskopach, cewnikach i a nawet na implantach (Hall-Stoodley i in., 2004).

1.18 Biofilm pałeczek *Salmonella Enteritidis*

Zdolność pałeczek *Salmonella Enteritidis* do wytwarzania biofilmu została wielokrotnie udowodniona w badaniach (Korber i in., 1997; Austin i in., 1998; Bower i Daeschel, 1999; Solano i in., 2002; Borges i in., 2018). Do najważniejszych komponentów wchodzących w skład biofilmu wytwarzanego przez te drobnoustroje należą włókienka celulozowe i amyloidowe, pozakomórkowe eDNA, antygeny O, kwasy tłuszczowe i białka błonowe (Mulcahy i in., 2008; Landini i in., 2010; Siringan i in., 2011; Das i in., 2013). Natomiast głównym regulatorem przejścia pałeczek *Salmonella* na tryb wzrostu jako biofilm jest regulator transkrypcji *CsgD*, który pozytywnie reguluje ekspresję operonu *csgBA* odpowiedzialnego za

syntezę fimbrii *curli* (Barnhart i Chapman, 2006). Biofilm zawierający pałeczki przez *S. Enteritidis* wykryto w takich miejscach jak urządzenia przemysłu przetwórstwa żywności, mięso drobiowe czy powierzchnia liści sałaty i kapusty (Patel i Sharma, 2010). Stanowią one potencjalny rezerwuuar tych patogenów. Dodatkowo, wielokrotnie większa odporność drobnoustrojów obecnych w biofilmie na czynniki środowiskowe sprawia, że usuwanie ich przy pomocy konwencjonalnych metod jest problematyczne (Høiby i in., 2010; Corcoran i in., 2014). Klasyczne metody eradykacji biofilmu zawierającego pałeczki *Salmonella* Enteritidis, w szczególności w środowiskach związanych z produkcją żywności niosą za sobą szereg skutków ubocznych. Stosowanie środków chemicznych negatywnie wpływa na walory produktów spożywczych oraz stanowi zagrożenie dla zdrowia konsumentów, a stosowanie chemioterapeutyków, przez zwiększenie się skali zjawiska lekooporności drobnoustrojów, jest nie tylko kosztowne, ale i nieskuteczne (Latou i in., 2014; Chylkova i in., 2017).

1.19 Biofilm *Escherichia coli* patogennych dla drobiu

Od ponad dekady wielokrotnie odnotowano zdolność bakterii klasyfikowanych jako APEC do tworzenia biofilmu (Bauchart i in., 2010; Ruan i in., 2021; Grakh i in., 2022). W biofilmie tworzonym przez bakterie z gatunku *Escherichia coli* do najważniejszych komponentów należą pozakomórkowa celuloza oraz włókna amyloidowe (Zogaj i in., 2001; Chapman i Johnson, 2002; Barnhart i Chapman, 2006). Biofilm tworzony przez *E. coli* nie tylko wykazuje podobieństwa strukturalne do biofilmu wytwarzanego przez pałeczki *Salmonella*, ale również jego powstawanie jest indukowane przez regulator *CsgD* odpowiedzialnego za syntezę fimbrii *curli* (Olsén i in., 1993; Gualdi i in., 2008). Dodatkowo, systemy quorum sensing nie tylko zwiększają szybkość tworzenia biofilmu przez *E. coli* ale również są odpowiedzialne za wiele jego aspektów, od przestrzennej organizacji struktury biofilmu aż po jego dyspersję (Irie i Parsek, 2008; Sun i in., 2022). Biofilm zawierający APEC stanowi coraz większy problem w produkcji drobiu (Skyberg i in., 2007; Grakh i in., 2022; Sivaranjani i in., 2022). Napotkano znaczące problemy zwalczając biofilm przy pomocy konwencjonalnych metod. Biofilm APEC wykazuje zwiększoną odporność na środki dezynfekujące. Wykazano zależność pomiędzy zwiększonym poziomem oporności bakterii na chemioterapeutyki a ich zdolnością do tworzenia biofilmu. Szczepy APEC posiadające zdolność do tworzenia biofilmu wykazały tolerancję takich chemioterapeutyków jak gentamycyna, amoksycylina, cefaleksyna, imipenem czy cefpodoksym (Skyberg i in., 2007; Rodrigues i in., 2019; Grakh i in., 2022). Niezbędne jest zatem opracowanie alternatywnych metod kontroli i eradykacji tych drobnoustrojów.

1.20 Zdolność bakteriofagów do redukcji biofilmu

Proces infekcji bakterii, które występują w formie biofilmu przebiega w sposób analogiczny do infekcji bakterii planktonicznych. Jednak struktura biofilmu ma znaczący wpływ na intensywność tego procesu. EPS stanowi fizyczną barierę ograniczającą możliwość adhezji cząstek faga do komórek gospodarza (Lebeaux i in., 2014; Simmons i in., 2018). Fagi mogą zostać uwięzione w strukturze biofilmu, co skutecznie uniemożliwia im infekcję komórek bakterii (Ferriol-González i Domingo-Calap, 2020). Jednak niektóre bakteriofagi posiadają w swoich kapsydach enzymy degradujące macierz pozakomórkową biofilmu, co zwiększa ich zdolność do penetracji jego struktury (Cornelissen i in., 2011). Bakterie obecne w biofilmie mogą pozakomórkowo wydzielać enzymy skutecznie inaktywujące bakteriofagi (Ferriol-González i Domingo-Calap, 2020). Efekt ten zachodzi poprzez immobilizację w macierzy biofilmu enzymów hydrolizujących białka kapsydu bakteriofagów wydzielanych pozakomórkowo przez drobnoustroje, co tworzy swoisty zewnętrzny układ trawienny biofilmu (Flemming i Wingender, 2010). W EPS wykazano aktywność takich enzymów jak peptydazy czy aminopeptydazy (Costerton i in., 1995; Baty i in., 1996). Kolejnym czynnikiem mającym wpływ na intensywność infekcji bakterii obecnych w biofilmie przez bakteriofagi jest stopień dojrzałości biofilmu. Wraz z postępującym procesem dojrzewania biofilmu liczba komórek o wysokiej intensywności procesów metabolicznych maleje, a te komórki, których metabolizm zwalnia, są mniej wydajne w procesie namnażania bakteriofaga, jednakże wciąż są zdolne do wytworzenia nowych wirionów. Co więcej struktura macierzy pozakomórkowej w dojrzałym biofilmie charakteryzuje się wysoką gęstością, przez co stanowi lepszą barierę przeciwko bakteriofagom. Objętość dojrzałego biofilmu jest znacznie większa niż na początku procesu jego tworzenia co utrudnia infekcję komórek znajdujących się głęboko w jego wnętrzu. Z drugiej strony, na powierzchni biofilmu występują komórki stosunkowo młode o intensywnym metabolizmie, co wspomaga proces infekcji wirusowej (Simmons i in., 2018). Dodatkowo, w strukturze biofilmu obecne są kanały, którymi dostarczane są do wewnętrznych warstw składniki odżywcze oraz woda. Kanały te są wykorzystywane przez bakteriofagi do penetracji struktury biofilmu (Boas i in., 2019). Biofilmy stanowią rezerwuuar bakteriofagów, ponieważ EPS stanowi barierę ochronną przeciwko niekorzystnym czynnikom środowiskowym (Briandet i in., 2008).

W literaturze przedstawiono wiele przykładów skutecznego zastosowania bakteriofagów przeciwko bakteriom obecnym w biofilmie. Bakteriofagi stosowano m.in.

w medycynie w celu zwalczania bakterii obecnych w biofilmie wielogatunkowym utworzonym na przeszczepionej pacjentce kości. W tym przypadku wykazano, że z biofilmu potraktowanego koktajlem bakteriofagów BFC1 specyficznych wobec *Staphylococcus aureus* całkowicie wyeliminowano obecność tego drobnoustroju (Van Nieuwenhuysse i in., 2021). Kolejny przykład medycznego zastosowania bakteriofagów stanowi trzech pacjentów, u których po wszczepieniu implantów kolana wykryto zainfekowanie wszczepów bakteriami w formie biofilmu. Po zastosowaniu w miejscu zakażenia zawiesiny bakteriofagów PP1493, PP1815, i PP1957 wykazano znaczne zmniejszenie stanu zapalnego a następnie całkowite ustąpienie objawów infekcji (Ferry i in., 2020). Bakteriofagi nie tylko skutecznie eliminowały drobnoustroje obecne w biofilmach utworzonych wewnątrz organizmu człowieka, ale również skutecznie eradykowały drobnoustroje obecne na powierzchniach sprzętów medycznych. Curtin i Donlan (2006) wykazali redukcję liczby *Staphylococcus epidermidis* o $5 \log_{10}$ jtk/cm² z powierzchni cewników przy pomocy faga 456.

Wykazano także skuteczne zastosowanie bakteriofagów przeciwko bakteriom obecnych w biofilmie utworzonym na powierzchni urządzeń przemysłowych. W procesie produkcji twarogu fagi Φ H5 i Φ A72 udokumentowano niemal całkowitą eliminację *S. aureus* z powierzchni maszyn, a w efekcie wyeliminowanie obecności tych drobnoustrojów w produkcji (García i in., 2007). W produkcji tuszek drobiowych bakteriofag Φ 2 redukował liczbę *C. jejuni* obecnych na powierzchni skór drobiowych o ponad 90% (Atterbury i in., 2003). W przypadku biofilmu obecnego na skórkach wieprzowych zaobserwowane ponad 99% eliminację *S. Typhimurium* po traktowaniu fagiem PC1 (Hooton i in., 2011). Bakteriofagi znalazły zastosowanie nie tylko w przemyśle przetwórstwa mięsa, ale również owoców i warzyw. Leverentz i in. (2001) wykazali redukcję liczby pałeczek *Salmonella* obecnych na powierzchni melonów o $2,5-3,5 \log_{10}$ jtk/cm² po traktowaniu koktajlem bakteriofagów SCPLX.

2. Cele i założenia

Rosnący problem lekooporności u bakterii, w szczególności patogenów ludzkich i zwierzęcych, szczególnie dotyka branży produkcji jaj i tuszek drobiowych, skutkując znacznym zwiększeniem zagrożenia bezpieczeństwa żywności i zdrowia publicznego ludzi. Dodatkowo, gdy patogeny występują w formie biofilmu, wykazują znacznie zwiększoną odporność na środki przeciwdrobnoustrojowe. Istotny obszar badań stanowi wykorzystanie litycznych bakteriofagów w zwalczaniu biofilmu bakterii patogennych takich jak *Salmonella* Enteritidis oraz *Escherichia coli* obecnego na powierzchniach biotycznych i abiotycznych. Do tej pory jednak brak doniesień o udokumentowanym zastosowaniu litycznych bakteriofagów w zwalczaniu patogenów występujących w biofilmie obecnym na powierzchni poideł dla drobiu w zakładach przemysłu produkcji jaj i tuszek drobiowych.

W związku z powyższym celem podjętych badań było sprawdzenie skuteczności bakteriofagów UPWr_S1-5 i UPWr_E1-4 przeciw biofilmom tworzonym przez *Salmonella* Enteritidis oraz *Escherichia coli*. Jego wykonanie oparte było na realizacji dwóch pomniejszych celów cząstkowych:

1. Porównanie efektywności działania bakteriofagów UPWr_S1-5 i UPWr_E1-4 przeciw biofilmom utworzonym przez pałeczki *Salmonella* i *Escherichia coli* na powierzchniach biotycznych i abiotycznych w warunkach *in vitro*.
2. Analiza zdolności redukcji koktajli bakteriofagów UPWr_S1-5 i UPWr_E1-4 przeciw biofilmom tworzonym na powierzchni poideł dla drobiu z wykorzystaniem modelu eksperymentalnie zakażonych kurcząt.

3 Materiały i metody

3.1 Materiały

3.1.1 Aparatura

Tabela 1 Urządzenia wykorzystane w badaniach

Urządzenie	Producent
Czytnik płytek Spark® Multimode Microplate Reader	Tecan Trading AG., Szwajcaria
Aparat do obrazowania metodą bioluminescencji i fluorescencji <i>in vivo</i> „NightOwl 983 imaging system”	Berthold, Bad Wildbad, Niemcy
Homogenizator Qiagen TissueLyser II	Qiagen, Niemcy
Mini Vortex Mixer SU1900	Bionovo, Polska
Wytrząsarka o ruchu okrężno-drgającym LLG-uniTEXER	Witko, Polska
Zestaw: próżniowy system opróżniający LLG-uniVacuusys	Bionovo, Polska
Cieplarka Memmert In110	Memmert, Niemcy
Wirówka Eppendorf 5810 R	Eppendorf, Niemcy
Sterylizator parowy SMS ESS-207	SMS, Polska

3.1.2 Podłoża mikrobiologiczne

LB (ang. Lysogenic Broth, A&A Biotechnology, Polska)/I

ekstrakt drożdżowy (ang. Yeast Extract, YE)	5 g
tryptonu	10 g
NaCl	10 g

LB (A&A Biotechnology, Polska)/I

ekstrakt drożdżowy (ang. Yeast Extract, YE)	5 g
tryptonu	10 g
NaCl	10 g
agar	15 g

MacConkey agar (Sigma, Niemcy)/l

laktoza jednowodna	5 g
tryptonu	10 g
NaCl	5 g
czerven obojętna	30 mg
agar	13,5 g

LB agar z erytromycyną (A&A Biotechnology, Polska)/l

ekstrakt drożdżowy (ang. Yeast Extract, YE)	5 g
tryptonu	10 g
NaCl	10 g
erytromycyna	50 mg
agar	15 g

3.1.3 Bufory i roztwory**Bufor PBS (buforowana fosforanem sól fizjologiczna) (Sigma-Aldrich, Niemcy)/l (pH 7,4)**

KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,42 g
NaCl	0,8 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

Bufor SGF (ang. Simulated Gastric Fluid)/l (pH 2)

HCl	0,01 M
pepsyna	3,2 g

Roztwór fioletu krystalicznego do barwienia/l

Fiolet krystaliczny	5 g
96% alkohol etylowy	1000 ml

3.1.4 Odczynniki chemiczne:

Tabela. 2 Spis odczynników chemicznych

Nazwa	Producent
Pepsyna	Sarstedt, Niemcy
Fiolet krystaliczny	Sigma-Aldrich, Niemcy
Erytromycyn	Sigma-Aldrich, Niemcy
Węglan wapnia	Sigma-Aldrich, Niemcy
Chlorek sodu	Sigma-Aldrich, Niemcy
96% alkohol etylowy	Sigma-Aldrich, Niemcy
Kwas solny 0,01 M	Sigma-Aldrich, Niemcy

3.1.5 Zwierzęta eksperymentalne

Kurczęta

W badaniach wykorzystano kurczęta w wieku 14 dni pozyskane z lokalnej fermy. Przed rozpoczęciem eksperymentu wymazy z kloaki każdego z kurcząt analizowano pod kątem obecności pałeczek *Salmonella* poprzez wymaz kloaki. Brojlery zostały poddane kontroli stanu zdrowotnego przez lekarza weterynarii poprzez oględziny zewnętrzne w celu oceny stanu zdrowia.

Pasza do żywienia zwierząt

- Brojler Growth 3000 (Tasomix, Polska)

Poidła dla drobiu

- Poidła dzwonowe 2 l z łączaniem zatraskowym (Polmark, Polska)

3.1.6 Szczepy bakterii

Bakterie *Salmonella* Enteritidis 327 lux pochodzą z Kolekcji Szczepów Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Szczepy,

Salmonella Enteritidis A41, A36, *Escherichia coli* 158B oraz 258 pochodzą z Kolekcji Szczepów Zakładu Epizootiologii i Kliniki Ptaków i Zwierząt Egzotycznych, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Szczep *S. Enteritidis* ATCC 13076 i *E. coli* NCTC 17848 oraz *E. coli* 158B lux pochodzą z Kolekcji Szczepów Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Szczepy *S. Enteritidis* A41, A36, ATCC 13076 oraz *E. coli* 158B, 258 i NCTC 17848 są szczepami izolowanymi ze środowiska. *S. Enteritidis* 327 lux oraz *E. coli* 158B lux zostały zmodyfikowane genetycznie w celu uzyskania zdolności bioluminescencji i oporności na erytromycynę, co stanowiło ich markery selekcyjne. Sposób modyfikacji szczepów został wcześniej opisany (Riedel i in., 2007) i wykorzystany (Kuźmińska-Bajor i in., 2015). W celu modyfikacji, do genomu bakterii został wstawiony operon lux pochodzący od *Photobacterium luminescens* oraz pięć genów *luxCDABE* za pomocą wektora p16Slux, zdolnego do integracji z chromosomem bakteryjnym. W ten sposób uzyskano szczepy posiadające zdolność ekspresji lucyferazy i oporność na erytromycynę.

Szczep *S. Enteritidis* A41 wykorzystywany był do namnażania fagów UPWr_S1, UPWr_S2 oraz UPWr_S5. Bakteriofagi UPWr_S3 i UPWr_S4 namnażano z wykorzystaniem szczepu *S. Enteritidis* A36. Szczepy *S. Enteritidis* 327 lux oraz *S. Enteritidis* ATCC 13076 wykorzystane w badaniach do wytwarzania biofilmu były wrażliwe na wszystkie bakteriofagi: UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4 i UPWr_S5. Jako gospodarza fagów UPWr_E1, UPWr_E2 i UPWr_E4 wykorzystano szczep *E. coli* 158B, natomiast faga UPWr_E3 szczep *E. coli* 258. Bakterie *E. coli* 158B lux oraz *E. coli* NCTC 17848 wykazywały wrażliwość na fagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3 i UPWr_E4.

3.1.7 Bakteriofagi

W pracy wykorzystano bakteriofagi UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4 i UPWr_S5, które zostały wcześniej szczegółowo scharakteryzowane (Kuźmińska-Bajor i in., 2021), oraz UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3 i UPWr_E4, które pochodzą z kolekcji bakteriofagów Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Wszystkie wymienione bakteriofagi nie posiadają zdolności wbudowania się w chromosom gospodarza, namnażają się wyłącznie w cyklu litycznym bez modyfikacji genomu komórki gospodarza. Bakteriofagi posiadają szerokie spektrum lityczne (Tabela 3).

Tabela 3. Wrażliwość szczepów bakteryjnych na bakteriofagi

Bakteriofag	<i>Salmonella</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella</i>
UPWr_S1	40	2	-
UPWr_S2	50	1	-
UPWr_S3	53	1	-
UPWr_S4	34	5	-
UPWr_S5	36	3	-
UPWr_E1	-	48	3
UPWr_E2	6	31	4
UPWr_E3	1	17	10
UPWr_E4	-	26	4

Koktajle bakteriofagów

W badaniach wykorzystano mieszaniny 3 bakteriofagów, w celu poszerzenia spektrum litycznego oraz uniknięcia zjawiska oporności na bakteriofagi. Bakteriofagi wchodzące w skład koktajli wybrano na podstawie spektrum działania i właściwości litycznych. Koktajle UPWr_S134 i UPWr_E124 uzyskano poprzez zmieszanie zawiesin bakteriofagów w sposób przedstawiony w Tabeli 4 i Tabeli 5. Miano koktajli wyznaczono z wykorzystaniem metody RTD (rozdz. 3.2.4) oraz metody płytek dwuwarstwowych (rozdz. 3.2.5). Wykazano, że miano koktajli bakteriofagów wynosi 3×10^9 PFU/ml.

Tabela 4, Skład 10 ml koktajlu UPWr_S134

<u>Bakteriofag</u>	<u>Miano</u> [PFU/ml]	<u>Objętość</u> [μl]
UPWr_S1	$3,08 \times 10^{10}$	325
UPWr_S3	$1,95 \times 10^{10}$	512
UPWr_S4	$2,65 \times 10^{10}$	377
podłoże LB	=	8786

Tabela 5. Skład 10 ml koktajlu UPWr_E124

<u>Bakteriofag</u>	<u>Miano</u> [PFU/ml]	<u>Objętość</u> [μl]
UPWr_E1	$9,25 \times 10^{10}$	108
UPWr_E2	$1,72 \times 10^{10}$	581
UPWr_E4	$3,4 \times 10^{10}$	294
podłoże LB	=	9017

3.2 Metody

3.2.1 Namnażanie bakterii

Bakterie *S. Enteritidis* A41, *S. Enteritidis* A36, *S. Enteritidis* ATCC 13076, *E. coli* 158B, *E. coli* 258, *E. coli* NCTC 17848) hodowano na podłożu MacConkey agar (rozdz. 3.1.2), a szczep *S. Enteritidis* 327 lux oraz *E. coli* 158B lux modyfikowane genetycznie i odporne na erytromycynę hodowano na podłożu LB zawierającym 50 μg/ml erytromycyny inkubowano przez noc w 37°C. W celu namnażania bakterii prowadzono hodowle płynne w pożywce LB w kolbach stożkowych o pojemności 250 ml przez noc w 37°C z mieszaniem z prędkością 150 rpm w celu zapewnienia odpowiedniego natlenienia drobnoustrojów.

3.2.2 Oznaczanie liczb bakterii

W celu ustalenia liczby bakterii w otrzymanych zawiesinach z roztworu wyjściowego wykonano serię dziesiętnych rozcieńczeń, które nakropiono w objętości po 20 μl na płytkę zawierającej agar LB. Po 24 h inkubacji płytek w 37°C liczono kolonie bakterii i wyznaczono ich liczbę w roztworze. Każde oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach. Liczbę bakterii wyrażano w jednostkach tworzących kolonie na ml zawiesiny jtk/ml i obliczano według wzoru:

$$\text{Liczba bakterii [jtk/ml]} = X * 50 * 10^Y$$

Gdzie X=liczba kolonii na płytce, 10^Y = rozcieńczenie zawiesiny

3.2.3 Namnażanie bakteriofagów

Bakteriofagi namnażano przy pomocy metody przedstawionej przez Oliveira (2009). W tym celu 10 ml płynnego podłoża LB szczepiono pojedynczą kolonią odpowiedniego

gospodarza i inkubowano w 37°C przy prędkości mieszania 150 rpm aż do uzyskania gęstości optycznej (OD_{600nm}) 0.2 ($\sim 2 \times 10^8$ jtk/ml). Następnie dodano 5 ml zawiesiny bakteriofagów i kontynuowano inkubację przez noc w 37°C i 150 rpm. Po jej zakończeniu hodowlę bakterii wirowano z prędkością 5000 x g przez 10 minut i supernatant filtrowano przy pomocy filtrów strzykawkowych o wielkości porów 0,22 μm . Otrzymany lizat fagowy dodano w całości do 150 ml świeżej hodowli gospodarza o gęstości optycznej (OD_{600nm}) 0.2 i inkubowano przez noc w 37°C i 150 rpm. Następnie powtarzano etapy wirowania i filtracji. Otrzymane w ten sposób zawiesiny bakteriofagów przechowywano w 4°C.

3.2.4 Routine Test Dilution (RTD) (Adams, 1959)

W celu ustalenia miana bakteriofagów w otrzymanych zawiesinach wykorzystano metodę Routine Test Dilution (RTD) (Adams, 1959). Z roztworu wyjściowego wykonano serię dziesiętnych rozcieńczeń. Płytkę Petriego z agarem LB podzielono na sekcje w liczbie odpowiadającej kolejnym dziesiętnym rozcieńczeniom zawiesiny. Po powierzchni płytki rozprowadzono 5 ml hodowli bakterii (rozdz. 3.2.1). Nadmiar hodowli usuwano, a płytkę inkubowano przez 1 h w 37°C. Na tak przygotowaną płytkę nakropiono 20 μl każdego rozcieńczenia zawiesiny na odpowiadający mu sektor. Po 24 h inkubacji płytek w 37°C liczono łysinki tworzone przez bakteriofagi i wyznaczano liczbę fagów pozostałych w roztworze. Każde oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach. Liczbę bakteriofagów wyrażano w jednostkach tworzących łysinki na ml zawiesiny PFU/ml.

$$\text{Miano bakteriofagów [PFU/ml]} = X * 50 * 10^Y$$

Gdzie X=liczba łysinek na płytce, 10^Y = rozcieńczenie zawiesiny

3.2.5 Oznaczenie liczby bakteriofagów metodą płytek dwuwarstwowych

Miano bakteriofagów w otrzymanych zawiesinach bakteriofagów oznaczano przy pomocy metody płytek dwuwarstwowych (Adams, 1959). 3 ml sterylnego podłoża LB zawierającego 0,5 % agaru upłynniano w łaźni wodnej, a następnie chłodzono do 45°C. Następnie dodano 100 μl hodowli bakterii uzyskanej przez zaszczepienie sterylnego podłoża LB czystą kulturą bakterii i nocną inkubacją w 37°C i 150 rpm. Do mieszaniny dodano 200 μl zawiesiny bakteriofagów o rozcieńczeniu pozwalającym na uzyskanie 30-300 łysinek na płytce. Rozcieńczenie wyznaczano na podstawie wyników uzyskanych przy zastosowaniu metody

RTD (rozdz. 3.2.4) Całość mieszano intensywnie przez 2 sekundy a następnie wylewano na płytkę Petriego z zestalonym agarem LB i mieszano ruchem ósemkowym w celu jednolitego rozprowadzenia drugiej warstwy agaru. Po zestaleniu płytki inkubowano przez noc w 37°C, a następnie liczono powstałe na płytce łysinki. Liczbę bakteriofagów wyrażano w jednostkach tworzących łysinki na ml zawiesiny (PFU/ml) według wzoru:

$$\text{Miano bakteriofagów [PFU/ml]} = X * 5 * 10^Y$$

Gdzie X=liczba łysinek na płytce, 10^Y = rozcieńczenie zawiesiny

3.2.6 Analiza stabilności bakteriofagów UPWr_S1-5

3.2.6.1 Wpływ pH na stabilność bakteriofagów UPWr_S1-5

W celu analizy stabilności bakteriofagów w środowisku o różnych wartościach pH, 1 ml koktajlu UPWr_S134 o mianie 1×10^7 PFU/ml dodano do 9 ml buforu o pH 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13 i inkubowano przez 1 h w 37°C przy prędkości mieszania 120 rpm. Po tym czasie, miano bakteriofagów oznaczono metodą RTD (rozdz. 3.2.4) oraz metodą płytek dwuwarstwowych (rozdz. 3.2.5).

3.2.6.2 Analiza stabilności bakteriofagów UPWr_S1-5 w symulowanych warunkach soku żołądkowego

W celu określenia stabilności bakteriofagów w warunkach imitujących sok żołądkowy kurcząt, do 9 ml buforu SGF o pH 2 i zawierającego pepsynę dodano 1 ml zawiesiny bakteriofagów UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 lub koktajl UPWr_S134 o mianie 1×10^7 PFU/ml i inkubowano przez 2 h w 37°C z wytrząsaniem 120 rpm. Co 15 minut pobierano 0,5 ml roztworu w celu oznaczenia liczby bakteriofagów metodą RTD (rozdz. 3.2.4) oraz metodą płytek dwuwarstwowych (rozdz. 3.2.5). Każde oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

3.2.6.3 Wpływ zobojętnienia buforu SGF na na aktywność bakteriofagów UPWr_S1-5

Analizowano wpływ dodatku 14% oraz 30 % CaCO_3 zobojętniających niskie pH buforu SGF na aktywność bakteriofagów UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4 i UPWr_S5.

W tym celu do 25 ml buforu SGF o pH 2 zawierającego pepsynę dodano 3,5 g CaCO₃ otrzymując stężenie 14% oraz 7,5 g otrzymując 30% stężenie.

Do 9 ml buforu SGF o pH 2 zawierającego pepsynę z dodatkiem CaCO₃ dodano 1 ml zawiesiny bakteriofagów o mianie 1 x 10⁷ PFU/ml, a następnie inkubowano przez 2 h w 37°C przy 120 rpm. Co 15 minut, pobierano 0,5 ml roztworu w celu oznaczenia miana bakteriofagów metodą RTD (rozdz. 3.2.4) oraz metodą płytek dwuwarstwowych (rozdz. 3.2.5). Analizę wykonano w trzech powtórzeniach.

3.2.6.4 Wpływ obecności paszy w buforze SGF na aktywność bakteriofagów UPWr_S1-5

Zmierzono wpływ dodatku wysokobiałkowej paszy dla drobiu do środowiska symulującego warunki panujące w żołądku kurcząt na aktywność bakteriofagów. Paszę dodano w ilości 7,5g w celu otrzymania końcowego stężenia 30% w buforze SGF o pH 2 zawierającego pepsynę. Do 9 ml tak przygotowanego roztworu dodano 1 ml koktajlu fagowego UPWr_S134 o mianie 1 x 10⁷ PFU/ml, inkubowano w 37°C i 120 rpm przez 2 h. 0,5 ml mieszaniny pobierano co 15 minut, przez 2 h i oznaczano liczbę bakteriofagów metodą RTD (rozdz. 3.2.4) oraz metodą płytek dwuwarstwowych (rozdz. 3.2.5). Eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach.

3.2.7 Redukcja biofilmu *Salmonella* Enteritidis na płytkach 96- dołkowych

3.2.7.1 Tworzenie biofilmu w płytkach 96-dołkowych przez pałeczki *Salmonella* Enteritidis

W celu tworzenia przez pałeczki *Salmonella* biofilmu na powierzchni polistyrenowych płytek 96-dołkowych, zastosowano zmodyfikowaną metodę zaproponowaną przez Woodward i in. (2000). W tym celu pojedynczą kolonią szczepów *S. Enteritidis* 327 lux i *S. Enteritidis* ATCC 13076 (rozdz. 3.2.1) inokulowano 50 ml podłoża LB i inkubowano przez noc w 37°C z prędkością mieszania 150 rpm. Następnie hodowla bakterii została rozcieńczona podłożem LB w celu osiągnięcia gęstości optycznej mierzonej przy długości fali 600 nm (OD_{600nm}) 0.2 (~2×10⁸ jtk/ml). 200 µl tej zawiesiny przeniesiono do dołków płytki 96-dołkowej (Sarstedt, Niemcy), następnie płytki inkubowano w 37°C przez 72 h. Po zakończonej inkubacji frakcja płynna została usunięta, biofilm płukano trzykrotnie 400 µl buforu PBS i suszono przez 10 minut. Kontrolę negatywną stanowiły próbki zawierające podłoże LB bez drobnoustrojów. Eksperymenty zostały przeprowadzone w 3 powtórzeniach.

3.2.7.2 Oznaczenie wielkości biofilmu

W celu zmierzenia liczby bakterii obecnych w biofilmie (rozdz. 3.2.7) do każdego z dołków dodano 100 µl roztworu 0,5% fioletu krystalicznego i pozostawiono na 20 minut pod przykryciem w temperaturze pokojowej. Po usunięciu pozostałości barwnika dołki płytki płukano trzykrotnie 200 µl buforu PBS w celu usunięcia pozostałości barwnika. Następnie dodano 100 µl 96 % etanolu w celu rozpuszczenia uwięzionego w strukturach biofilmu fioletu krystalicznego, a następnie mierzono absorbancję roztworu przy długości fali 570 nm za pomocą czytnika płytek Tecan.

3.2.7.3 Wyznaczenie poziomu produkcji biofilmu przez pałeczki *Salmonella Enteritidis*

Na podstawie zmierzonej absorbancji biofilmu (rozdz. 3.2.7.1), szczepy pałeczek *Salmonella* zostały sklasyfikowane według metody przedstawionej przez Stepanovic i in. (2004) w następujących kategoriach: brak biofilmu producent, słaby, umiarkowany lub silny producent biofilmu, gdzie średnica zewnętrzna odcięcia (ODc) zdefiniowana jako trzy odchylenia standardowe powyżej średniej absorbancji kontroli negatywnej, którą stanowiły dołki zawierające wyłącznie podłoże LB, stanowiła parametr selekcyjny. Oznaczenia zdolności szczepów bakterii do tworzenia biofilmu przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Klasyfikacja szczepów bakterii pod względem zdolności do tworzenia biofilmów

Wartość absorbancji	Zdolność tworzenia biofilmu
Abs. < ODc	Brak
ODc < Abs < 2 x ODc	Słaba
2 x ODc < Abs. < 4 x ODc	Umiarkowana
4 x O.D.c < Abs	Silna

3.2.7.4 Redukcja biofilmu pałeczek *Salmonella Enteritidis* w płytkach 96-dółkowych przez bakteriofagi UPWr_S1-5

W celu analizy zdolności bakteriofagów UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 oraz koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 do redukcji biofilmu tworzonego na powierzchni płytek 96- dołkowych przez pałeczki *S. Enteritidis* 327 lux oraz *S. Enteritidis* ATCC 13076 wykorzystano 72-godzinny biofilm (rozdz. 3.2.7). Uzyskany biofilm płukano

dwukrotnie buforem PBS, a następnie dodano po 200 μ l bakteriofagów UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4 lub UPWr_S5 i koktajlu UPWr_S134 o mianach 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 oraz 1×10^1 PFU/ml i inkubowano przez 4 godziny w 37°C. Po zakończeniu inkubacji zawiesinę bakteriofagów usunięto, biofilm trzykrotnie płukano 100 μ l buforu PBS, suszono przez 10 minut w temperaturze pokojowej i barwiono 0,5 % roztworem fioletu krystalicznego przez 20 minut (rozdz. 3.2.7.2). Barwione płytki analizowano przy pomocy czytnika płytek Tecan przy długości fali 570 nm. Biofilmy nieinkubowane z bakteriofagami użyto jako kontrolę pozytywną. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach.

3.2.8 Redukcja biofilmu *Salmonella* Enteritidis na powierzchni stali nierdzewnej

3.2.8.1 Tworzenie biofilmu na powierzchni stali nierdzewnej przez pałeczki *Salmonella* Enteritidis

W celu tworzenia biofilmu przez pałeczki *Salmonella* na powierzchni stali nierdzewnej zastosowano zmodyfikowaną metodę według Orsinger-Jacobsen i in. (2013). Pojedynczą kolonią szczepów *S. Enteritidis* 327 lux i *S. Enteritidis* ATCC 13076 (rozdz. 3.2.1) inokulowano 20 ml podłoża LB a następnie inkubowano w 37°C z prędkością 150 rpm przez noc. Następnie hodowle bakterii wprowadzono do kolb stożkowych o pojemności 250 ml zawierających 100 ml sterylnego podłoża LB oraz 24 sterylnych podkładek pod śruby ze stali nierdzewnej o średnicy 10 mm. Następnie kolby wraz zawartością inkubowano na wytrząsarce w 37°C z prędkością 150 rpm przez 72 h. Po tym czasie, za pomocą sterylnej pęsety każdą z podkładek przeniesiono do dołka płytki 24-dołkowej i płukano trzykrotnie buforem PBS w ilości 1 ml w celu usunięcia bakterii planktonicznych, a następnie analizowano za pomocą metody barwienia fioletem krystalicznym (rozdz. 3.2.8.2).

3.2.8.2 Oznaczenie wielkości biofilmu

W celu oznaczenia wielkości tworzonego biofilmu (rozdz. 3.2.8.1) do dołków płytki 24-dołkowej, w której znajdowały się podkładowe do śrub dodano 500 μ l 0,5% roztworu fioletu krystalicznego i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej pod przykryciem. Następnie barwnik usuwano i każdy z dołków płukano trzykrotnie 1 ml buforu PBS, suszono przez 10 min. Następnie podkładowe przenoszono do nowej płytki 24-dołkowej, dodano 500 μ l 96 % etanolu i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. W następnym etapie

usuwano przy pomocy pęsety stalowe podkładki i analizowano absorbancję uzyskanych roztworów za pomocą czytnika płytek Tecan przy długości fali 570 nm. Eksperymenty zostały przeprowadzone w 3 powtórzeniach.

3.2.8.3 Redukcja biofilmu przez bakteriofagi UPWr_S1-5 tworzonych przez pałeczki *Salmonella* Enteritidis na powierzchni stali nierdzewnej

W celu analizy zdolności bakteriofagów do redukcji biofilmu tworzonych na powierzchni stali nierdzewnej przez bakterie z rodzaju *Salmonella* dodano do dołków płytki 24-dołkowej zawierających podkładki pod śruby z biofilmem (rozdz. 3.2.8.1) 500 µl zawiesiny bakteriofagów UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4 lub UPWr_S5 oraz koktajlu UPWr_S134 o mianach 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 i 1×10^1 PFU/ml i inkubowano przez 4 godziny w 37°C. Kontrolę pozytywną stanowiły podkładki z biofilmem inkubowane w podłożu LB. Następnie usunięto z dołków zawiesinę bakteriofagów, podkładki płukano trzykrotnie buforem PBS i pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Biofilm barwiono fioletem krystalicznym i oznaczano absorbancję uzyskanych roztworów (rozdz. 3.2.8.2). Eksperymenty zostały przeprowadzone w 3 powtórzeniach.

3.2.9 Redukcja biofilmu *Salmonella* Enteritidis na powierzchni liści sałaty

3.2.9.1 Tworzenie biofilmu na powierzchni liści sałaty przez pałeczki *Salmonella* Enteritidis

W celu tworzenia biofilmu przez pałeczki *Salmonella* na powierzchni liści sałaty pobrano 4-6 liści z warstw wewnętrznych rośliny. Liście te umyto pod bieżącą wodą, suszono w temperaturze pokojowej a następnie cięto na kawałki o wymiarach 2 x 2 cm przy pomocy sterylnego skalpela. Następnie fragmenty liści sterylizowano poprzez zanurzenie w 70% etanolu, a następnie suszono. 25 ml nocnej hodowli bakterii *S. Enteritidis* 327 lux i *S. Enteritidis* ATCC 13076 (rozdz. 3.2.1) rozcieńczono przy pomocy podłoża LB aż do uzyskania gęstości optycznej (OD_{600nm}) 0.2 ($\sim 2 \times 10^8$ jtk/ml). Kawałki liści sałaty inkubowano przez 120 s w 1 w tak przygotowanej zawieszynie pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux lub *S. Enteritidis* ATCC 13076 w celu adsorpcji komórek drobnoustrojów do powierzchni liści. Kawałki suszono w temperaturze pokojowej przez 10 minut i przeniesiono na płytki Petriego zawierające

nawilżoną sterylnym buforem PBS bibułę zapewniającą wysoką wilgotność w liczbie 4 sztuk liści/płytkę. Tak przygotowane płytki inkubowano w 37°C przez 72 h (Kroupitski i in., 2009).

3.2.9.2 Oznaczenie liczby pałeczek *Salmonella* obecnych w biofilmie

W celu oznaczenia liczby żywych pałeczek *Salmonella* w biofilmie na powierzchni sałaty (rozdz. 3.2.9.1), liście przeniesiono za pomocą sterylnej pęsety do probówek typu Falcon o objętości 15 ml zawierających 1 ml PBS i mieszano przy pomocy urządzenia typu Vortex przez 1 minutę w celu oderwania komórek drobnoustrojów ze struktur biofilmu. W uzyskanej zawieszynie oznaczano liczbę pałeczek *Salmonella* metodą opisaną w rozdziale 3.2.2. Wyniki przedstawiano jako liczbę jednostek tworzących kolonie na cm² powierzchni liścia sałaty.

3.2.9.3 Redukcja biofilmu pałeczek *Salmonella* Enteritidis na powierzchni liści sałaty przez bakteriofagi UPWr_S1-5

Dojrzały, 72-godzinny biofilm tworzony przez pałeczki *S. Enteritidis* 327 lux i *S. Enteritidis* ATCC 13076 na powierzchni liści sałaty (rozdz. 3.2.9.1) redukowano przy pomocy zawiesin bakteriofagów UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 i koktajlu bakteriofagów UPWr_S134. W tym celu kawałki liści, na powierzchni których znajdował się biofilm pałeczek *Salmonella* (rozdz. 3.2.9.1) zanurzono na 3 minuty w 1 ml zawiesiny bakteriofagów o mianach 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 oraz 1×10^1 PFU/ml lub w buforze PBS w przypadku kontroli pozytywnej, suszono przez 10 min i inkubowano przez 4 godziny w 37°C na płytkach Petriego zawierających sterylną bibułę nasączoną sterylnym buforem PBS w celu zapewnienia odpowiedniej wilgotności. Po zakończeniu etapu inkubacji na powierzchni kawałków oznaczano liczbę żywych pałeczek *Salmonella* w sposób opisany w rozdziale 3.2.9.2. Wyniki przedstawiono jako liczbę jednostek tworzących kolonie na cm² powierzchni liścia sałaty.

3.2.10 Redukcja biofilmu *Salmonella* Enteritidis na powierzchni poideł dla drobiu w warunkach *in vitro*

3.2.10.1 Tworzenie biofilmu przez pałeczki *Salmonella* Enteritidis na poidłach dla drobiu w warunkach *in vitro*:

W badaniach wykorzystano dwuczęściowe poidła dzwonowe z zatraskiem. Poidła wypełniono 3 rodzajami medium: podłożem LB, jego 10-krotne rozcieńczeniem oraz wodą destylowaną, w ilościach 100 ml. Do każdego z poideł dodano 1 ml nocnej hodowli bakterii *S. Enteritidis* 327 lux (rozd. 3.2.1) rozcieńczonej do uzyskania gęstości optycznej 0,01 ($\sim 1 \times 10^7$ jtk/ml) i pozostawiono w temperaturze 25°C na 9 dni. Od 1 dnia eksperymentu, co 24 godziny pobierano wymazy z 1 cm² powierzchni poidła w celu oznaczenia liczby pałeczek *Salmonella*. Wymazy pobierano za pomocą sterylnej wymazówki, którą następnie przenoszono do probówek typu Falcon o pojemności 15 ml zawierających 1 ml buforu PBS, które następnie wytrząsano przez 30 minut w 200 rpm. Wykonywano serię rozcieńczeń dziesiętnych i oznaczano liczbę pałeczek *Salmonella* metodą opisaną w rozdziale 3.2.2 na podłożu LB z dodatkiem 500mg/ml erytromycyny. Wyniki tych oznaczeń odczytywano po inkubacji płytek LB w 37°C przez 24 h i przedstawiono jako liczbę jtk/cm² poidła. Eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach.

3.2.10.2 Redukcja biofilmu pałeczek *Salmonella* Enteritidis na poidłach dla drobiu w warunkach *in vitro*:

W celu analizy zdolności koktajlu UPWr_S134 do redukcji liczby pałeczek *S. Enteritidis* w biofilmie tworzonym na powierzchni poideł dla drobiu w warunkach *in vitro*, wykorzystano poidła wraz z podłożem LB, jego 10-krotne rozcieńczeniem oraz wodą destylowaną przygotowane według metody opisanej w rozdziale 3.2.10.1. Do wypełnionych odpowiednim medium poideł dodano 1 ml nocnej hodowli bakterii *S. Enteritidis* 327 lux (rozd. 3.2.1), i rozcieńczonej do uzyskania gęstości optycznej (OD_{600nm}) 0,01 ($\sim 1 \times 10^7$ jtk/ml) mierzonej przy długości fali 600 nm. Do każdego medium dodano 1 ml koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 o mianie 1×10^9 PFU/ml. Następnie poidła inkubowano przez 9 dni w temperaturze 25°C. Wymazy z powierzchni poideł wykonywano i oznaczano w nich liczbę pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux (rozd. 3.2.10.1). Wyniki przedstawiano jako liczbę jtk/cm² powierzchni poidła.

3.2.10.3 Pomiar bioluminescencji

W celu pomiaru bioluminescencji kolonii bakterii obecnych na płytkach wykorzystywano aparat „NightOwl II LB 983” (rozd. 3.1.1). Urządzenie posiada ruchomą, wyskokoczułą i wolno skanującą kamerę CCD, wyposażoną w matrycę wielkości 1024x1024x13,6 μm oraz obiektyw o średnicy 25 mm i ogniskowej $f=0,95$. Kamera jest chłodzona za pomocą ogniwa Peltiera i powietrza. Jej wydajność kwantowa wynosi 90%, rejestruje obraz w zakresie od kilku milisekund do kilku godzin. Światłoszczelna komora urządzenia umożliwia detekcję światła o małym natężeniu. Urządzenie jest obsługiwane przez program „Berthold WinLight 32” na PC z systemem operacyjnym Windows XP.

Pomiar bioluminescencji wykonywano przez umieszczenie płytki Petriego zawierającej kolonie pałeczek *Salmonella* Enteritidis 327 lux ekspresjonujące gen lucyferazy (rozd. 3.1.6) w światłoszczelnej komorze aparatu. Następnie dwuetapowo mierzono bioluminescencję płytki. W pierwszym etapie dokonywano pomiaru tzw. „tła”, rejestrowano obraz płytki w słabym świetle widzialnym, zapisywano w postaci czarno-białych plików zdjęciowych. W drugim etapie mierzono bioluminescencję w przedziale czasowym 20 sekund w warunkach pełnego zaciemnienia. Względne natężenia emitowanej przez pałeczki *Salmonella* bioluminescencji zapisywano jako barwne obrazy i nakładano na powstały w pierwszym etapie pomiaru obraz. Następnie automatycznie liczono kolorowe punkty przedstawiające kolonie bakteryjne przejawiające zdolność bioluminescencji. Otrzymany w ten sposób ostateczny obraz zapisywano w pamięci komputera.

3.2.11 Eradykacja pałeczek *Salmonella* z powierzchni poidel dla drobiu na modelu eksperymentalnie zakażonych kurcząt

W celu analizy zdolności koktajlu bakteriofagowego UPWr_S134 do zwalczania pałeczek *Salmonella* obecnych na powierzchni poidel dla drobiu wykorzystano model eksperymentalnie zakażonych kurcząt. Eksperymenty na zwierzętach przeprowadzono zgodnie z Międzynarodową Konwencją o Ochronie zwierząt oraz za przyzwoleniem Lokalnej Komisji Etyki ds. Eksperymentów na Zwierzętach (protokół 114/2015, Wrocław, Polska). Dwutygodniowe kurczęta pochodzące z lokalnej fermy podzielono na 4 grupy liczące po 10 ptaków. Każda z grup umieszczona została w klatkach zlokalizowanych w osobnych pomieszczeniach. W każdej z klatek znajdowały się 2 kurczęta oraz 1 poidło. Przez cały czas trwania eksperymentu kurczęta utrzymywano w temperaturze 25°C i zapewniano im wodę oraz pożywienie bez ograniczeń. Poidła dzwonowe, wypełniano wodą zawierającą 1×10^5 jtk/ml

bakterii *Salmonella* Enteritidis 327 lux. Dodatkowo, w grupie 3 do wody, w której znajdowały się pałeczki *Salmonella* dodano również koktajl bakteriofagów UPWr_S134 o mianie końcowym 1×10^7 PFU/ml. Woda w poidłach grupy 2 (kontrola negatywna) zawierała wyłącznie koktajl bakteriofagów. W grupie 4 w poidłach znajdowała się wyłącznie woda pitna (Tabela 7). Eksperyment prowadzono przez 9 dni. Każdego dnia dokonywano wymazów z powierzchni 1 cm^2 poidła i oznaczano liczbę pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux (rozdz. 3.2.10.1). Ze względu na obecność mikroflory innej niż szczepu *S. Enteritidis* 327 lux odpornej na erytromycynę do odczytu zastosowano urządzenie wykrywające bioluminescencję NighOwl 983 (rozdz. 3.2.10.3). W wymazach oznaczano ogólną liczbę drobnoustrojów. W tym celu po zakończonym etapie wytrząsania wymazówek wykonywano serię dziesiętnych rozcieńczeń i oznaczano metodą opisaną w rozdziale 3.2.2 ogólną liczbę drobnoustrojów. Każde z oznaczeń wykonywano w trzech powtórzeniach. Po zakończeniu trwania eksperymentu wszystkie ptaki poddano eutanazji przez dekapitację w narkozie wziewnej. Narządy wewnętrzne takie jak wątroba, śledziona oraz bursa Fabrycjusza ważono, a następnie homogenizowano. W tym celu wątroby wraz z 50 ml PBS homogenizowano przez 5 minut aparacie typu „Stomacher” BagMixer 400S. Śledziona i bursy Fabrycjusza homogenizowano po umieszczeniu 5 ml PBS przez 5 minut przy 20 Hz przy pomocy Qiagen TissueLyser II. W celu oznaczenia liczby pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux w organach wewnętrznych wykonano serię dziesiętnych rozcieńczeń i wysiewano na płytki zawierające agar LB z 500 $\mu\text{g/ml}$ erytromycyny, liczbę kolonii oznaczano poprzez pomiar bioluminescencji (rozdz. 3.2.10.3).

Tabela 7. Dodatki do wody pitnej poszczególnych grup kurcząt

Numer grupy	<i>S. Enteritidis</i> 327 lux [jtk/ml]	UPWr_S134 [PFU/ml]
1	1×10^5	0
2	0	1×10^7
3	1×10^5	1×10^7
4	0	0

3.2.12 Analiza stabilności bakteriofagów UPWr_E1-4

3.2.12.1 Analiza stabilności bakteriofagów UPWr_E1-4 w symulowanym soku żołądkowym

W celu określenia stabilności bakteriofagów w warunkach imitujących sok żołądkowy kurcząt, do 9 ml buforu SGF o pH 2 zawierającego pepsynę dodano 1 ml zawiesiny bakteriofagów zawierających pojedyncze bakteriofagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 lub koktajl UPWr_E124 o mianach 1×10^7 PFU/ml i inkubowano przez 2 h w 37°C z wytrząsaniem 120 rpm. Co 15 minut pobierano 0,5 ml roztworu w celu oznaczenia liczby bakteriofagów wykorzystując metodę RTD (rozdz. 3.2.4) oraz metodą płytek dwuwarstwowych (rozdz. 3.2.5). Każde oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

3.2.12.2 Wpływ zobojętnienia buforu SGF na na aktywność bakteriofagów UPWr_E1-4

Analizowano wpływ dodatku 14% m/v oraz 30% m/v CaCO₃ zobojętniających niskie pH buforu SGF na aktywność bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4. W tym celu do 25 ml buforu SGF o pH 2 zawierającego pepsynę dodano 3,5 g CaCO₃ otrzymując stężenie 14% oraz 7,5 g otrzymując 30% stężenie.

Do 9 ml buforu SGF o pH 2 zawierającego pepsynę z dodatkiem CaCO₃ dodano 1 ml zawiesiny bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 bądź koktajl UPWr_E124 o mianach 1×10^7 PFU/ml, inkubowano przez 2 h w 37°C przy wytrząsaniu 120 rpm. 0,5 ml mieszaniny pobierano co kwadrans i oznaczano liczbę bakteriofagów metodą RTD (rozdz. 3.2.4) oraz metodą płytek dwuwarstwowych (rozdz. 3.2.5). Każde oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

3.2.13 Redukcja biofilmu patogennych dla drobiu *E. coli* na płytkach 96-dołkowych

3.2.13.1 Tworzenie biofilmu w płytkach 96-dołkowych przez patogenne dla drobiu *E. coli*

W celu tworzenia przez *E. coli* biofilmu na powierzchni polistyrenowych płytek 96-dołkowych, zastosowano zmodyfikowaną metodę zaproponowaną przez Woodward i in. (2000). Pojedynczą kolonią bakterii *E. coli* 158B lux i *E. coli* NCTC 13076 (rozdz. 3.2.1) inokulowano 50 ml podłoża LB, i inkubowano przez noc w 37°C z prędkością mieszania 150 rpm. Następnie hodowlę bakterii rozcieńczono podłożem LB do osiągnięcia gęstości optycznej 0.2 ($\sim 2 \times 10^8$ jtk/ml) mierzonej przy długości fali 600 nm (OD_{600nm}). 200 µl zawiesiny przeniesiono do dołków płytki 96-dołkowej i inkubowano w 37°C przez 72 h. Po zakończonej

inkubacji usunięto frakcję płynną, biofilm płukano trzykrotnie 200 µl buforu PBS i pozostawiono do wyschnięcia. Kontrolę negatywną stanowiły próbki zawierające podłoże LB nie zawierające drobnoustrojów. Eksperymenty przeprowadzono w 3 powtórzeniach.

3.2.13.2 Oznaczenie wielkości biofilmu

Wielkość biofilmu mierzono (rozd. 3.2.13.1) poprzez barwienie fioletem krystalicznym do każdego z dołków dodano po 100 µl 0,5% roztworu fioletu krystalicznego i barwiono przez 20 min pod przykryciem w temperaturze pokojowej. Następnie barwnik usunięto, dołki trzykrotnie przepłukano 200 µl buforu PBS, w celu usunięcia pozostałości barwnika. W kolejnym etapie dodano 100 µl 96 % etanolu celem rozpuszczenia uwiecznionego w strukturach biofilmu barwnika i następnie mierzono absorbancję przy długości fali 570 nm na czytniku płytek Tecan.

3.2.13.3 Wyznaczenie poziomu produkcji biofilmu przez patogenne dla drobiu *E. coli*

Na podstawie zmierzonej absorbancji biofilmu tworzonego w sposób opisany w rozdz. 3.2.13.1, szczepy *E. coli* zostały sklasyfikowane w sposób opisany w rozdziale 3.2.7.3.

3.2.13.4 Redukcja biofilmu tworzonego przez patogenne dla drobiu *E. coli* w płytkach 96-dółkowych przez bakteriofagi UPWr_E1-4

W celu analizy zdolności bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4, oraz koktajlu bakteriofagów UPWr_E124 do redukcji biofilmu tworzonego na powierzchni płytek 96- dołkowych przez bakterie *E. coli* 158B lux lub *E. coli* NCTC17848 wykorzystano 72-godzinny biofilm (rozd. 3.2.13.1). Znad uzyskanego biofilmu usunięto frakcję płynną, płukano dwukrotnie 100 µl buforu PBS, i dodano 200 µl zawiesiny bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 lub koktajlem UPWr_E124 o mianach 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 oraz 1×10^1 PFU/ml. Następnie płytki inkubowano przez 2 godziny w 37°C. W następnym etapie frakcję płynną usuwano, biofilm płukano trzy razy 400 µl buforu PBS, pozostawiono do wyschnięcia i wybarwiono 0,5% roztworem fioletu krystalicznego przez 20 minut (rozd. 3.2.11.2). Płytki po wybarwianiu oznaczano czytnikiem płytek Tecan przy długości fali 570 nm. Kontrolę pozytywną stanowiły

dołki zawierające biofilmy nieinkubowane z bakteriofagami. Eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach.

3.2.14 Redukcja biofilmu tworzonego przez patogenne dla drobiu *E. coli* na powierzchni stali nierdzewnej

3.2.14.1 Tworzenie biofilmu na powierzchni stali nierdzewnej przez patogenne dla drobiu *E. coli*

Biofilm tworzone przy pomocy zmodyfikowanej metody według Orsinger-Jacobsen i in. (2013) Pojedynczą kolonią bakterii *E. coli* 158B lux lub *E. coli* NCTC17848 inokulowano 20 ml podłoża LB (rozdz.3.2.1), inkubowano w 37°C z prędkością 150 rpm przez noc, a następnie wprowadzono do kolb stożkowych pojemności 250 ml zawierającymi 100 ml sterylnego podłoża LB oraz 24 sterylne podkładki pod śruby o średnicy 10 mm i 100 ml sterylnego podłoża LB w ilości pozwalającej uzyskać gęstość optyczną 0.2 ($\sim 2 \times 10^8$ jtk/ml) mierzoną przy długości fali 600 nm (OD_{600nm}). Następnie kolby wraz zawartością inkubowano w 37°C z prędkością mieszania 150 rpm przez 72 h. Następnie, każdą z podkładek przeniesiono sterylną pęsetą do dołka płytki 24-dołkowej i płukano 3 razy 1 ml buforu PBS w celu usunięcia bakterii planktonicznych, a następnie analizowano za pomocą metody barwienia fioletem krystalicznym (rozdz. 3.2.8.2).

3.2.14.2 Oznaczenie wielkości biofilmu

W celu oznaczenia wielkości tworzonego biofilmu (rozdz.3.2.14.1) do dołków płytki 24-dołkowej, w której znajdowały się podkładki do śrub dodano 500 µl 0,5% roztworu fioletem krystalicznego i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej pod przykryciem. Następnie usuwano barwnik, dołki płukano trzykrotnie 1 ml buforu PBS i suszono przez 10 min. Podkładki przenoszono do nowej płytki 24-dołkowej, dodano 500 µl 96 % etanolu i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie usuwano stalowe podkładki i mierzono absorbancję uzyskanych roztworów przy pomocy czytnika płytek Tecan przy długości fali 570 nm. Eksperymenty przeprowadzono w 3 powtórzeniach.

3.2.14.3 Redukcja biofilmu przez bakteriofagi UPWr_E1-4 tworzonych przez patogenne dla drobiu *E. coli* na powierzchni stali nierdzewnej

W celu analizy zdolności redukcji biofilmu *E. coli* tworzonych na powierzchni stali nierdzewnej przez bakteriofagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajl UPWr_E124 do dołków płytki 24-dołkowej zawierających podkładki z biofilmem (rozd. 3.2.14.1) dodano 500 μ l zawiesiny bakteriofagów o mianach 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 oraz 1×10^1 PFU/ml, a następnie inkubowano w 37°C przez 4 godziny. Kontrolę pozytywną stanowiły podkładki inkubowane w buforze PBS. Zawiesinę bakteriofagów usunięto, podkładki płukano trzykrotnie 1 ml buforu PBS w celu usunięcia bakterii wolno pływających i pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie biofilm barwiono 0,5% roztworem fioletu krystalicznego i oznaczano absorbancję uzyskanych roztworów (rozd. 3.2.14.2). Eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

3.2.15 Redukcja biofilmu tworzonych przez patogenne dla drobiu *E. coli* na powierzchni liści sałaty

3.2.15.1 Tworzenie biofilmu na powierzchni liści sałaty przez patogenne dla drobiu *E. coli*

W celu tworzenia na powierzchni liści sałaty biofilmu przez bakterie *E. coli* 158B lux i *E. coli* NCTC 17848, z każdej główki sałaty pobrano 4-6 wewnętrznych liści. Liście umyto pod bieżącą wodą, suszono w temperaturze pokojowej przez 10 minut i cięto sterylnym skalpelem na kawałki o wymiarach 2 x 2 cm. Następnie fragmenty liści sterylizowano poprzez zanurzenie w 70% etanolu i suszono. 25 ml nocnej hodowli bakterii *E. coli* 158B lux lub *E. coli* NCTC 17848 (rozd. 3.2.1 rozcieńczono przy pomocy podłoża LB w ilości niezbędnej do uzyskania gęstości optycznej 0.2 ($\sim 2 \times 10^8$ jtk/ml) mierzonej przy długości fali 600 nm (OD_{600nm}). Pocięte liście sałaty inkubowano przez 2 min w 1 ml tak przygotowanej zawiesiny bakterii w celu adsorpcji komórek drobnoustrojów do powierzchni roślin. Kawałki suszono pod komorą laminarną przez 20 minut, przeniesiono sterylną pęsetą w liczbie 4 sztuk liści/płytkę na płytki Petriego zawierających nawilżoną sterylnym buforem PBS bibułę, zapewniającą wysoką wilgotność, a następnie zabezpieczono przy pomocy parafilmu i inkubowano w 37°C przez 72 h (Kroupitski i in. (2009).

3.2.15.2 Oznaczenie liczby patogennych dla drobiu *E. coli* obecnych w biofilmie

W celu oznaczenia liczby żywych bakterii *E. coli* w biofilmie na powierzchni sałaty (rozd. 3.2.15.1) kawałki liści przeniesiono sterylną pęsetą do probówek typu Falcon o objętości 15 ml zawierających 1 ml buforu PBS, intensywnie mieszano przy pomocy urządzenia Vortex przez 60 sekund w celu oderwania komórek drobnoustrojów ze struktur biofilmu, a następnie oznaczano liczbę drobnoustrojów w uzyskanym roztworze przy pomocy metody opisanej w rozdziale 3.2.2. Wyniki przedstawiano jako liczbę jednostek tworzących kolonie na cm² powierzchni liścia sałaty.

3.2.15.3 Redukcja biofilmu tworzony przez patogenne dla drobiu *E. coli* na powierzchni liści sałaty przez bakteriofagi UPWr_E1-4

Trzydniowy biofilm tworzony na powierzchni kawałków liści sałaty przez bakterie *E. coli* 158B lux i *E. coli* NCTC 17848 (rozd. 3.2.15.1) redukowano za pomocą bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajlu bakteriofagów UPWr_E124. Kawałki liści, na powierzchni których znajdował się biofilm *E. coli* (rozd. 3.2.15.1) zanurzono na 180 s w 1 ml zawiesiny bakteriofagów o mianach 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 i 1×10^1 PFU/ml lub w buforze PBS w przypadku kontroli pozytywnej, a następnie inkubowano przez 4 godziny w 37°C. W kolejnym etapie na powierzchni kawałków liści oznaczano liczbę żywych komórek drobnoustrojów metodą opisaną w rozdziale 3.2.15.2. Wyniki przedstawiono jako liczbę jednostek tworzących kolonie na cm² powierzchni liścia sałaty. Eksperymenty wykonano w 3 powtórzeniach.

3.2.16 Redukcja biofilmu tworzony przez patogenne dla drobiu *E. coli* na powierzchni mięsa drobiowego

3.2.16.1 Tworzenie biofilmu na powierzchni mięsa drobiowego przez patogenne dla drobiu *Escherichia coli*

Oznaczono zdolność bakterii *Escherichia coli* 158B lux i NCTC 17848 do tworzenia biofilmu na powierzchni mięsa drobiowego. W tym celu przy pomocy sterylnego skalpela cięto pierś kurczaka na kawałki o wymiarach 1 x 1 x 1 cm. W probówce typu Falcon o pojemności 50 ml umieszczono 25 ml nocnej hodowli bakterii *E. coli* 158B lux lub *E. coli* NCTC 17848 i (rozd. 3.2.1), rozcieńczono przy pomocy podłoża LB do uzyskania gęstości optycznej 0.2 ($\sim 2 \times 10^8$ jtk/ml) mierzonej przy długości fali 600 nm (OD_{600nm}). Kawałki piersi kurczaka

zanurzono w 5 ml uzyskanej zawiesiny bakterii na 120 sekund i suszono w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Następnie kawałki przeniesiono w liczbie 4 na płytkę Petriego zawierającą nasączoną sterylnym PBS bibułę umieszczoną w celu zapewnienia wysokiej wilgotności, zabezpieczono za pomocą parafilmu i inkubowano przez 7 dni w 4°C. 1, 2, 5 oraz 7 dnia pobierano 4 kawałki mięsa w celu analizy liczby bakterii *E. coli*. Po zakończeniu inkubacji przez 7 dni w 4°C pozostałe kawałki mięsa inkubowano przez 4 h w temperaturze 37°C. Kontrolę negatywną stanowił kawałki zanurzone w buforze PBS zamiast hodowli bakterii.

3.2.16.2 Oznaczenie liczby bakterii *E. coli* obecnych w biofilmie

Kawałki mięsa przenoszono do próbek typu Falcon o pojemności 15 ml zawierających 2 ml buforu PBS i homogenizowano przy pomocy Qiagen TissueLyser II. W próbkach po homogenizacji oznaczano liczbę żywych *E. coli* metodą opisaną w rozdziale 3.2.2. Wyniki przedstawiono jako liczbę jednostek tworzących kolonię na 1cm³ mięsa.

3.2.16.3 Redukcja biofilmu tworzonego przez patogenne *E. coli* na powierzchni mięsa drobiowego przez bakteriofagi UPWr_E1-4

W celu analizy zdolności bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajlu UPWr_E124 do redukcji biofilmu tworzonego na kawałkach mięsa drobiowego (rozd. 3.2.16.1) 25 ml nocnej hodowli bakterii *E. coli* 158B lux lub *E. coli* NCTC 17848 (rozd. 3.2.2). rozcieńczono przy pomocy podłoża LB do uzyskania gęstości optycznej 0.2 ($\sim 2 \times 10^8$ jtk/ml) mierzonej przy długości fali 600 nm (OD_{600nm}). Kawałki piersi kurczaka zanurzono w uzyskanej zawieszynie bakterii na 60 sekund, a następnie suszono w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Następnie, kawałki zanurzono na 2 minuty w zawieszynie bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 i koktajlu bakteriofagów UPWr_E124, o mianie 1×10^9 PFU/ml i suszono przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Kawałki mięsa w liczbie 4 sztuk/płytkę umieszczono na płytce Petriego zawierającej nasączoną buforem PBS sterylną bibułę, umieszczoną celem utrzymania wysokiej wilgotności, zabezpieczono przy pomocy parafilmu i inkubowano w 4 °C przez 7 dni. Pierwszego, drugiego, piątego oraz siódmego dnia 4 kawałki piersi kurczaka umieszczano w próbkach typu Falcon zawierających 2 ml buforu PBS i homogenizowano przy pomocy Qiagen TissueLyser II. W uzyskanym roztworze liczbę bakterii *E. coli* oznaczano w sposób opisany w rozdziale 3.2.2.

Wyniki przedstawiono jako liczbę jednostek tworzących kolonię na 1 cm³ mięsa. Eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach.

3.2.17 Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki przedstawione w postaci średnich arytmetycznych wraz z odchyleniem standardowym zebrano i przeanalizowano przy użyciu programu Statistica w wersji 13 oprogramowania (TIBCO Software Inc.). Poziom istotności $p < 0,05$ ustalono z góry dla wszystkich testów statystycznych. Analizę wyników badań stabilności bakteriofagów w zależności od pH i w środowisku symulowanego soku żołądkowego kurcząt oraz wyników badań redukcji biofilmu na powierzchni płytek 96-dołkowych, stali nierdzewnej, powierzchni liści sałaty, powierzchni mięsa drobiowego i powierzchni poidła dla drobiu przeprowadzono niezależnie w trzech powtórzeniach. Liczbę bakterii oraz bakteriofagów transformowano logarytmicznie przed analizą statystyczną. Dane otrzymane z testu biofilmu na powierzchniach biotycznych i abiotycznych analizowano przez zastosowanie jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA). Test t-Studenta wykorzystano do analizy statystycznej redukcji bakterii w przypadku biofilmu na poidłach dla drobiu *in vitro* oraz w przypadku modelu eksperymentalnie zakażonych kurcząt. W celu porównania odczytów redukcji bakterii w narządach eksperymentalnie zakażonych kurcząt przeprowadzono nieparametryczny test U Manna-Whitneya i porównano dane zebrane podczas szacowania obciążenia bakteryjnego w narządach wewnętrznych kurcząt.

4. Wyniki

4.1 Ocena zdolności bakteriofagów UPWr_S1-5 do redukcji pałeczek *Salmonella* Enteritidis

4.1.1 Namnażanie bakteriofagów UPWr_S1-5

W wyniku dwustopniowego namnażania bakteriofagów UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 uzyskano zawiesiny bakteriofagowe o mianach od $1,96 \times 10^{11}$ PFU/ml i $2,65 \times 10^{11}$ PFU/ml w przypadku bakteriofagów UPWr_S2 oraz UPWr_S4 do aż $1,95 \times 10^{15}$ PFU/ml uzyskanego dla bakteriofaga UPWr_S3. Wartości mian zawiesin UPWr_S1 i UPWr_S5 miały wartości rzędu odpowiednio $3,08 \times 10^{13}$ PFU/ml i $3,52 \times 10^{12}$ PFU/ml (Tabela 8).

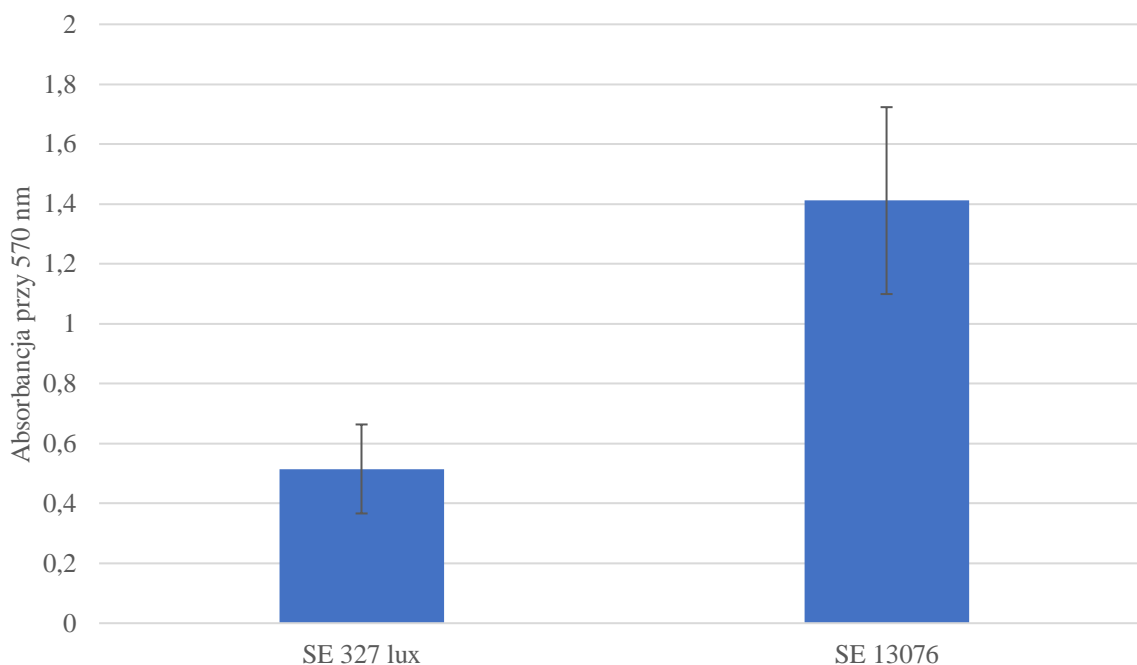
Tabela 8. Miana zawiesin bakteriofagów UPWr_S1-5

Nazwa Bakteriofaga	Miano [PFU/ml]
UPWr_S1	$3,08 \times 10^{13}$
UPWr_S2	$1,96 \times 10^{11}$
UPWr_S3	$1,95 \times 10^{15}$
UPWr_S4	$2,65 \times 10^{11}$
UPWr_S5	$3,52 \times 10^{12}$

4.1.2 Zdolność tworzenia biofilmu przez pałeczki *Salmonella* Enteritidis

Zdolność tworzenia biofilmu przez szczepy *S. Enteritidis* 327 lux i *S. Enteritidis* ATCC 13076 została ustalona według skali przedstawionej w rozdziale 3.2.7.3, według której średnica zewnętrzna odcięcia (ODc), której wartość stanowią trzy odchylenia standardowe powyżej średniej absorbancji kontroli negatywnej, którą stanowiła absorbancja wybarwionego podłoża LB. ODc stanowiła parametr selekcyjny. Szczepy zostały sklasyfikowane według wartości absorbancji: Abs. < ODc brak zdolności tworzenia biofilmu ODc < Abs < 2 x ODc słaby producent biofilmu, $2 \cdot ODc < Abs. < 4 \times ODc$ umiarkowany producent biofilmu i $4 \times O.D.c < Abs.$ silny producent biofilmu (Stepanovic i in., 2004). Szczep *S. Enteritidis* 327 lux wytworzył biofilm na poziomie $OD_{570} = 0,512$, co klasyfikuje go jako umiarkowanego producenta biofilmu, natomiast szczep *S. Enteritidis* ATCC 13076 wytworzył biofilm na poziomie $OD_{570} =$

1,411, przez co jego zdolności do tworzenia biofilmu zostały uznane jako silne. Wykazano, że szczep *S. Enteritidis* posiadał 2,8 razy większą zdolność tworzenia biofilmu w stosunku do szczepu *S. Enteritidis* 327 lux (Wykres 1).

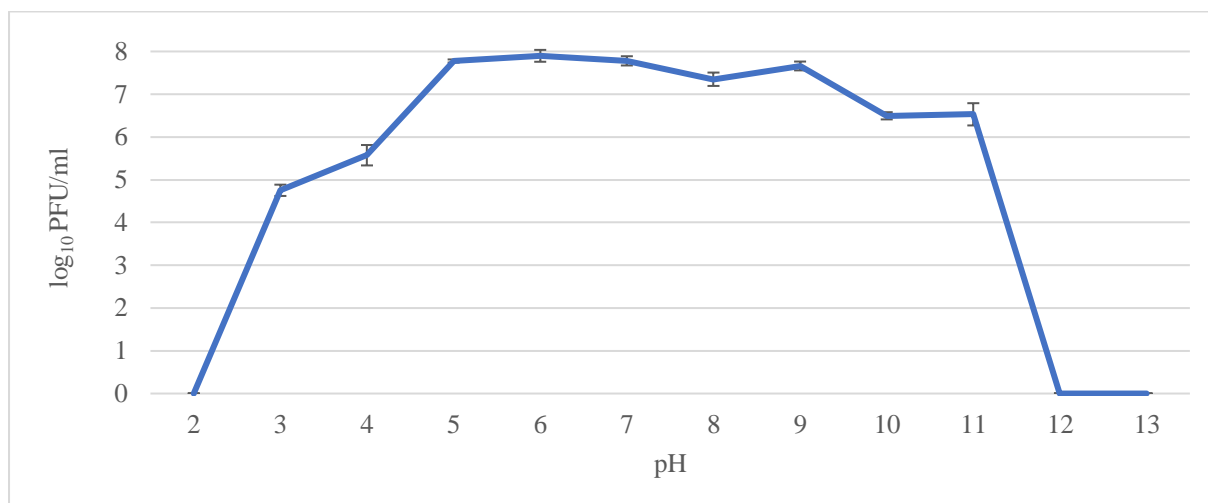


Wykres 1. Poziom biofilmu tworzony przez pałeczki *Salmonella* Enteritidis 327 lux i *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076

4.1.3 Aktywność bakteriofagów w zależności od pH środowiska

Aktywność koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 została analizowana w dla wartości pH od 2 do 13. W celu analizy zachowywania aktywności, pomocnego w ustaleniu wysokości miana dodatku regulującego pH wymaganej do skutecznego zastosowania w środowisku żołądka kur. Dla najniższego analizowanego pH 2 wykazano brak aktywności bakteriofagów. Natomiast dla pH 3 aktywność koktajlu bakteriofagów ma wartość 4,75 log₁₀ PFU/ml co stanowi 61% aktywności bakteriofagów w pH 7, która wynosi 7,78 log₁₀ PFU/ml i jest statystycznie istotna ($p < 0,05$). W pH 5 bakteriofagi z koktajlu UPWr_S134 wykazują miano o wartości 7,77 log₁₀ PFU/ml, co nie odbiega w istotny sposób od wartości w pH 7 ($p < 0,05$). Podobne miano wykazano w przypadku środowisk o pH 6,7,8 i 9, miały one wartości odpowiednio 7,89 log₁₀ PFU/ml, 7,78 log₁₀ PFU/ml, 7,35 log₁₀ PFU/ml, 7,66 log₁₀ PFU/ml ($p < 0,05$). Natomiast w pH 10 i 11 miana koktajlu UPWr_S134 wynosi odpowiednio 6,9 log₁₀

PFU/ml i $6,53 \log_{10}$ PFU/ml ($p < 0,05$). W środowisku o pH 12 i 13 miano zawiesiny spadło do zera.



Wykres 2. Miano koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 po inkubacji w środowiskach o różnych pH

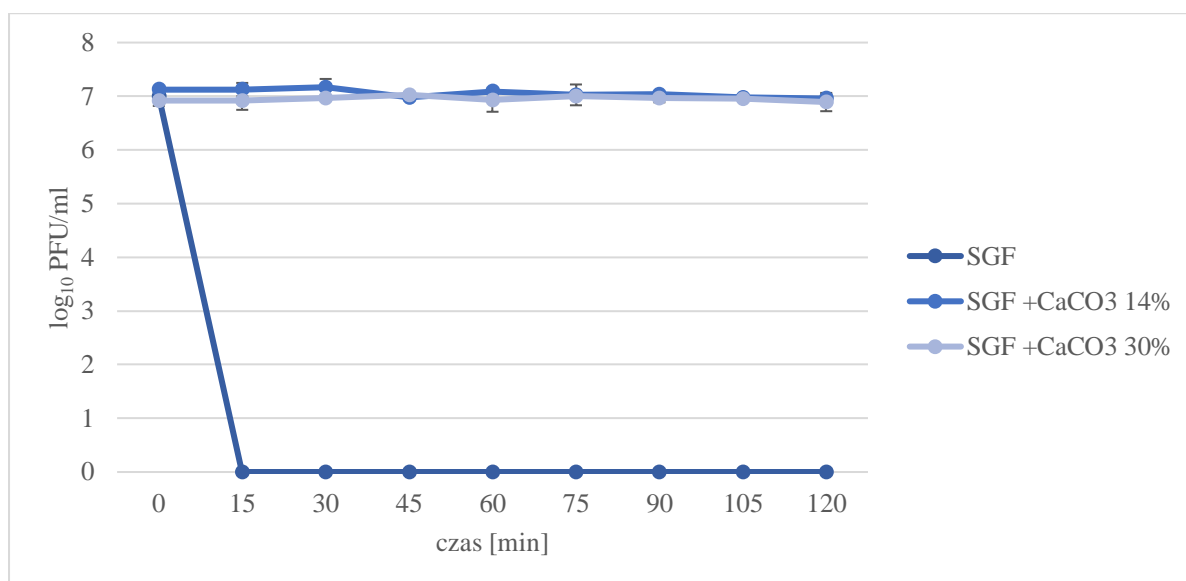
4.1.4 Aktywność bakteriofagów UPWr_S1-5 w środowisku symulowanego kwasu żołądkowego kurcząt SGF

W środowisku buforu imitującego *in vitro* sok żołądkowy kurcząt zaobserwowano spadek miana zawiesin bakteriofagów UPWr_S1, UPWr_S3, UPWr_S4 oraz koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 z wartości początkowych odpowiednio $8 \log_{10}$ PFU/ml, $7,8 \log_{10}$ PFU/ml, $8,25 \log_{10}$ PFU/ml i $7,76 \log_{10}$ PFU/ml do zera po 15 minutach inkubacji, natomiast w przypadku zawiesin bakteriofagów UPWr_S2, i UPWr_S5 wykazano spadek miana z wartości początkowych $7,32 \log_{10}$ PFU/ml i $7,51 \log_{10}$ PFU/ml do $1,70 \log_{10}$ PFU/ml w ciągu pierwszych 15 minut inkubacji. Po kolejnych 15 minutach inkubacji wykazano brak aktywności bakteriofagów (Wykres 3-8).

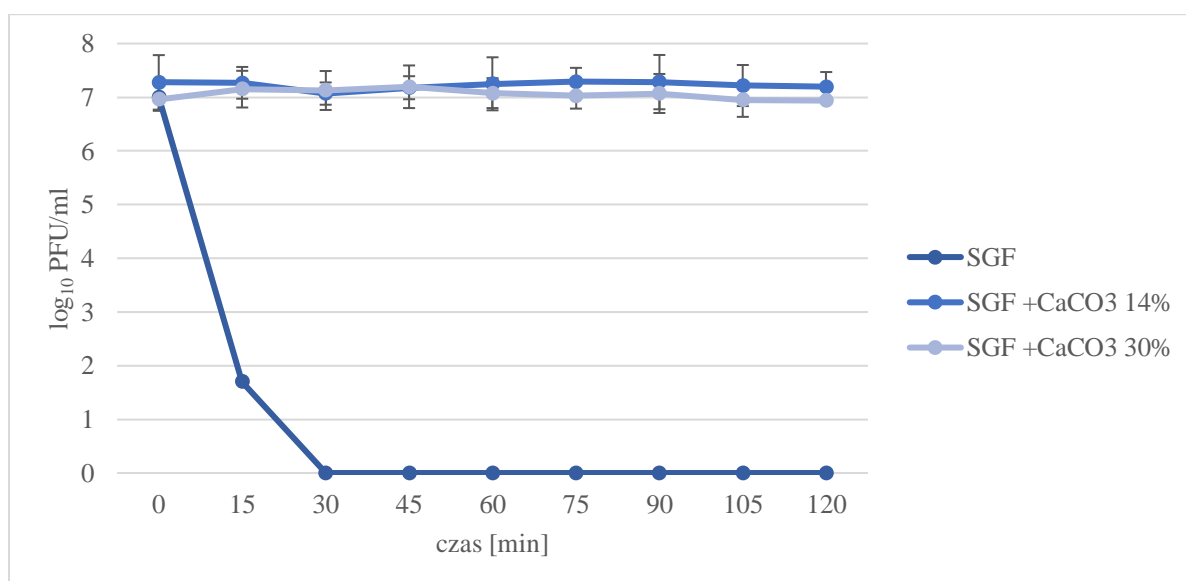
Podczas inkubacji bakteriofagów UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 oraz koktajlu UPWr_S134 w buforze SGF z dodatkiem 14% CaCO_3 nie wykazano znaczącego spadku miana zawiesin. Miano bakteriofagów UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 i koktajlu UPWr_S134 utrzymywało się na poziomie $7 \pm 0,3 \log_{10}$ PFU/ml przez 120 min inkubacji. W przypadku, gdy dodatek CaCO_3 wynosił 30%, również nie zaobserwowano istotnego statystycznie spadku mian zawiesin ($p < 0,05$). Po 120 minutach inkubacji miana zawiesin UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 oraz

koktajlu UPWr_S134 mieściły się w zakresie od 6,8 log₁₀ PFU/ml do 7,2 log₁₀ PFU/ml (Wykres 3-8).

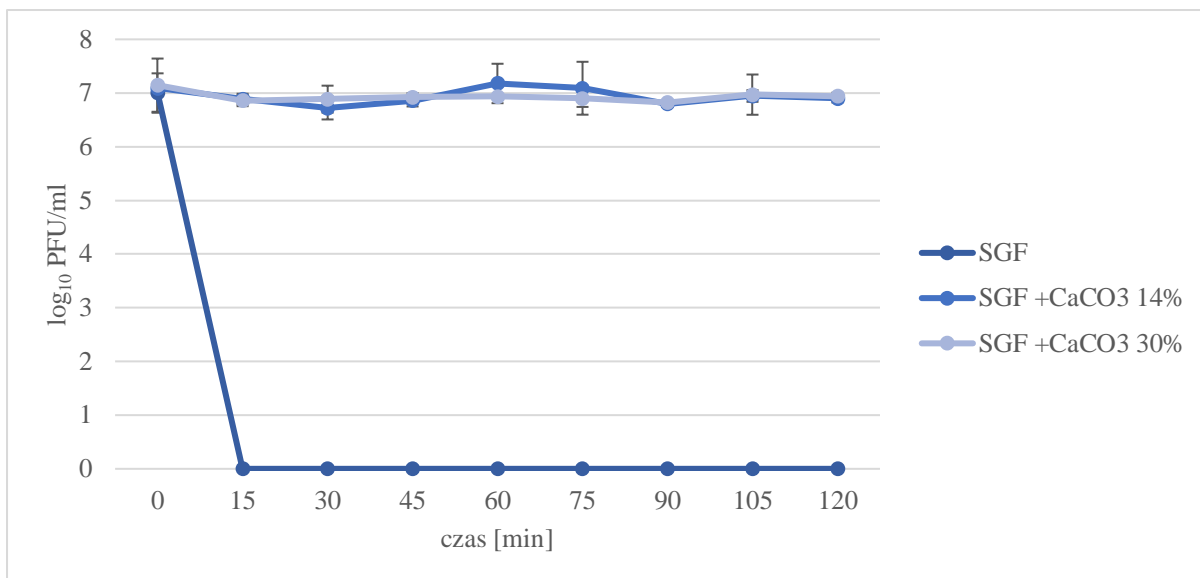
Zbadano wpływ dodatku wysokobiałkowej paszy na miano koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 w warunkach imitujących sok żołądkowy *in vitro*. Wykazano, że przy zastosowaniu 30% dodatku paszy do buforu SGF nie zaobserwowano istotnego ($p < 0,05$) obniżenia miana koktajlu UPWr_S134 przez cały okres 120 min inkubacji, które mieściło się w zakresie od 6,6 log₁₀ PFU/ml do 6,8 log₁₀ PFU/ml (Wykres 8).



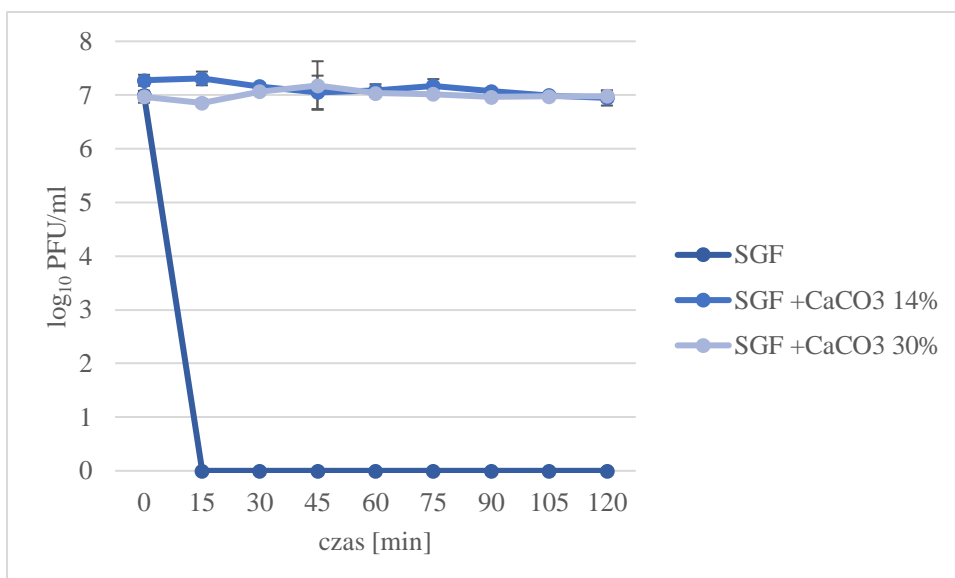
Wykres 3. Miano bakteriofaga UPWr_S1 w buforze SGF



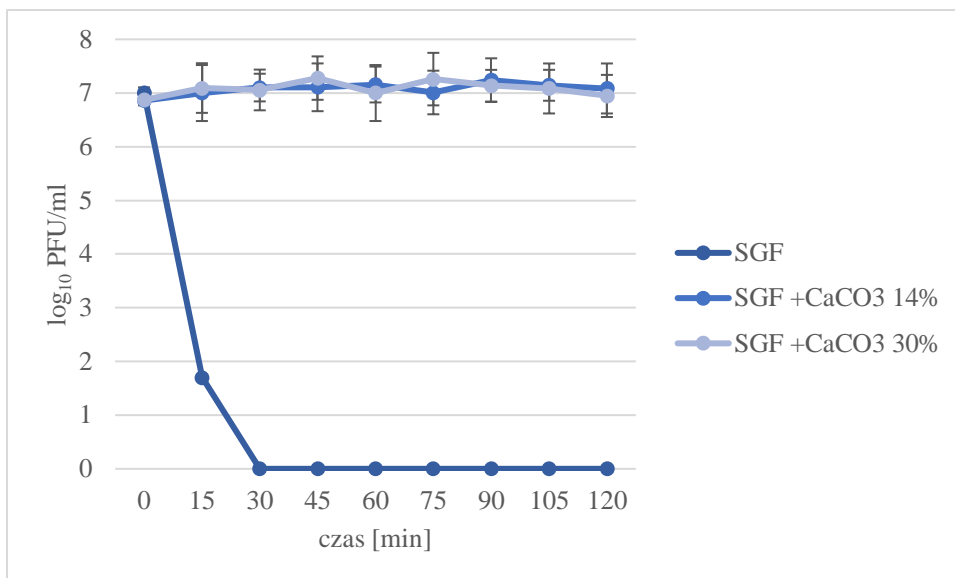
Wykres 4. Miano bakteriofaga UPWr_S2 w buforze SGF



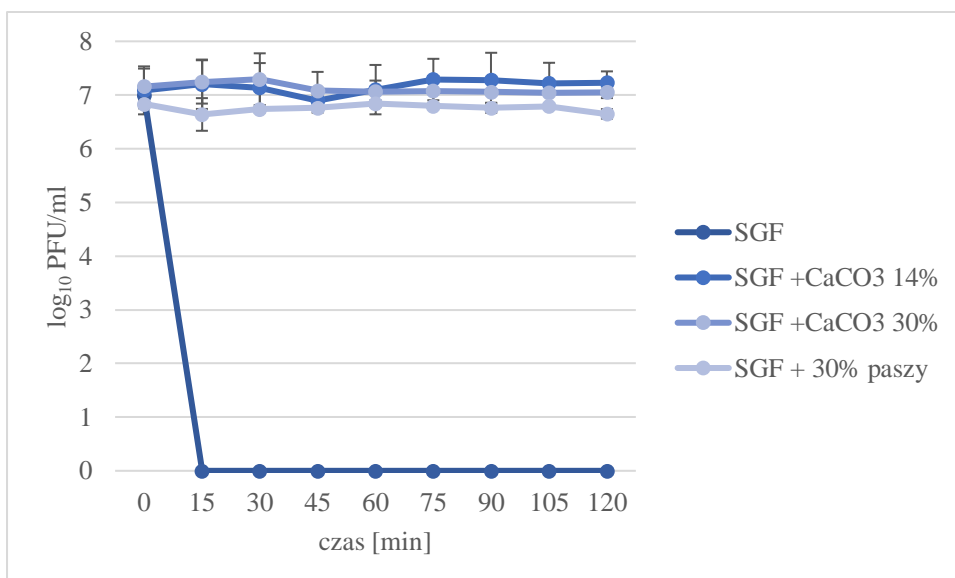
Wykres 5. Miano bakteriofaga UPWr_S3 w buforze SGF



Wykres 6. Miano bakteriofaga UPWr_S4 w buforze SGF



Wykres 7. Miano bakteriofaga UPWr_S5 w buforze SGF

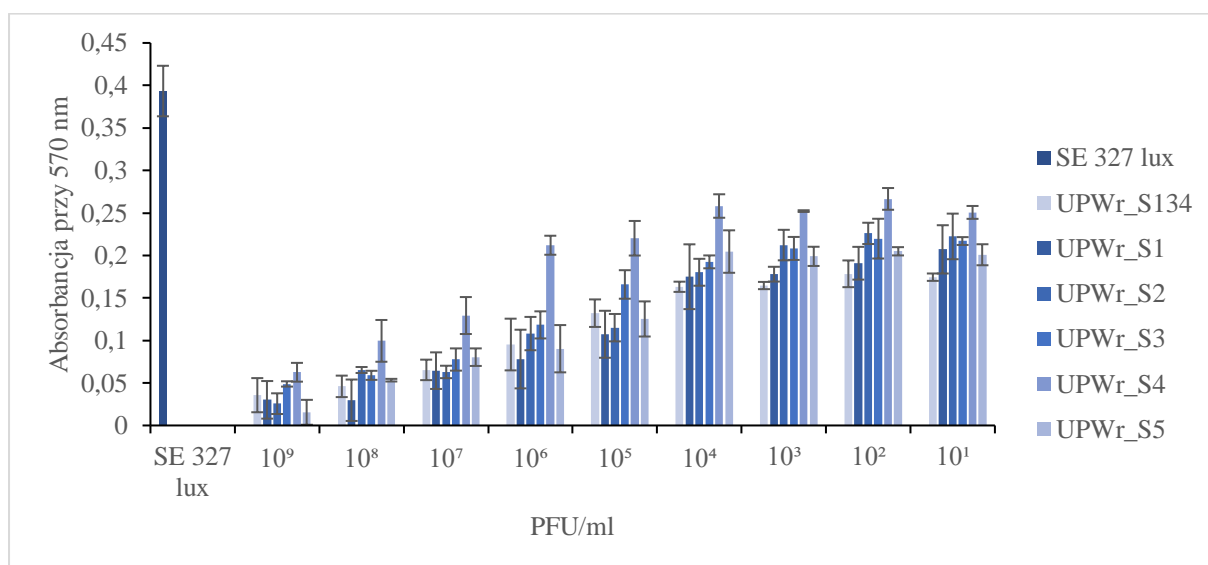


Wykres 8. Miano koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 w buforze SGF

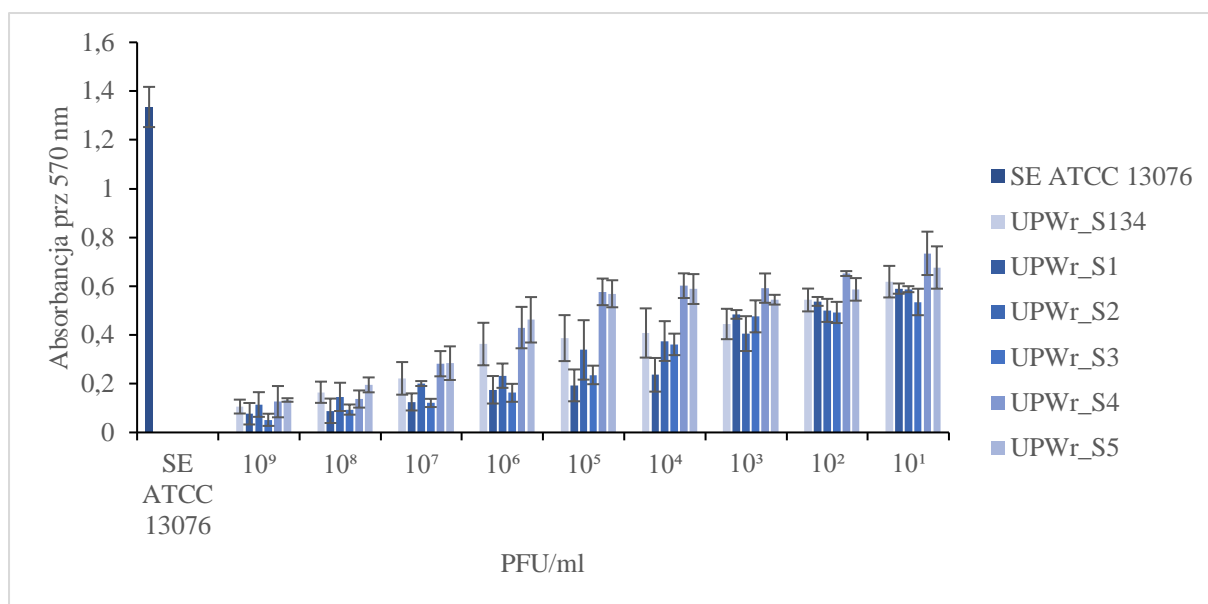
4.1.7 Degradacja biofilmu tworzonego przez *Salmonella Enteritidis* na powierzchni płytek 96-dółkowych

Zbadano aktywność bakteriofagów UPWr_S1-5 w postaci pojedynczych bakteriofagów UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 oraz koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 wobec biofilmów tworzonych przez pałeczki *S. Enteritidis* 327 lux i *S. Enteritidis* 327 lux na powierzchni polistyrenowych płytek 96-dółkowych. Jako kontrolę pozytywną szczep *S. Enteritidis* ATCC 13076 charakteryzujący się wysoką zdolnością tworzenia biofilmu

(rozdz. 4.1). Zaobserwowano istotną redukcję wielkości biofilmu tworzego przez pałeczki *S. Enteritidis* 327 lux oraz *S. Enteritidis* ATCC 13076 niezależnie od zastosowanego miana bakteriofagów ($p < 0,05$) (Wykres 9, Wykres 10). Redukcja biofilmu tworzego przez *S. Enteritidis* 327 lux przy zastosowaniu najwyższej miana zawiesiny 1×10^9 PFU/ml nie różniła się w sposób znaczący niezależnie od analizowanego bakteriofaga i mieściła się w zakresie od 84% w przypadku bakteriofaga UPWr_S4 do 96% przy wykorzystaniu bakteriofaga UPWr_S5 natomiast przy zastosowaniu najniższej miana 1×10^1 PFU/ml wartości te miały zakres od 36% dla faga UPWr_S4 do 55% uzyskanych przez wykorzystanie koktajlu UPWr_S134. Bakteriofagi UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 oraz koktajl bakteriofagów UPWr_S134 wykazały wobec biofilmu tworzego przez *S. Enteritidis* ATCC 13076 wyższą zdolność do redukcji biofilmu w porównaniu z biofilmem *S. Enteritidis* 327 lux. W tym przypadku zastosowanie miana 1×10^9 PFU/ml skutkowało redukcją biofilmu w zakresie od 90% dla bakteriofaga UPWr_S5 do 96% dla bakteriofaga UPWr_S3, natomiast dla najniższego miana 1×10^1 PFU/ml wykazano skuteczność w zakresie od 44% uzyskanych przez zastosowanie faga UPWr_S4 do 59% dla bakteriofaga UPWr_S3.



Wykres 9. Redukcja biofilmu pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux tworzego na powierzchni płytek 96-dołkowych przez bakteriofagi UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 oraz koktajl UPWr_S134 o mianach w zakresie od 1×10^9 PFU/ml do 1×10^1 PFU/ml.

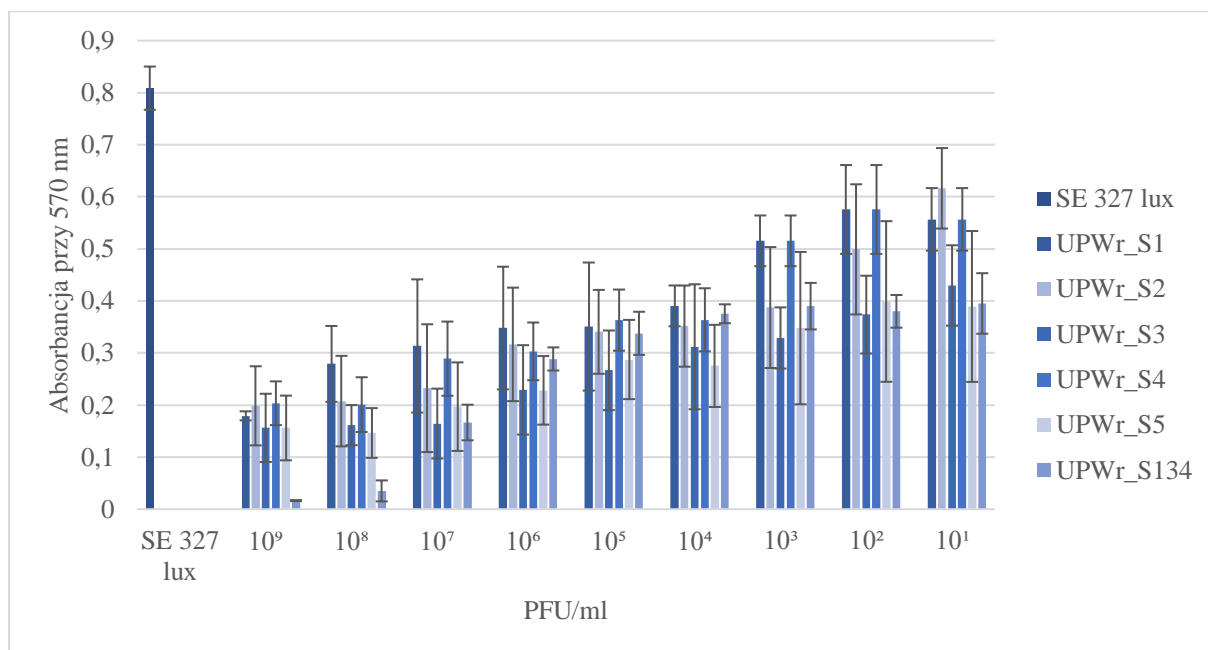


Wykres 10. Redukcja biofilmu pałeczek *S. Enteritidis* ATCC 13076 tworzonego na powierzchni płytek 96-dołkowych przez bakteriofagi UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 oraz koktajl UPWr_S134 o mianach w zakresie od 1×10^9 PFU/ml do 1×10^1 PFU/ml.

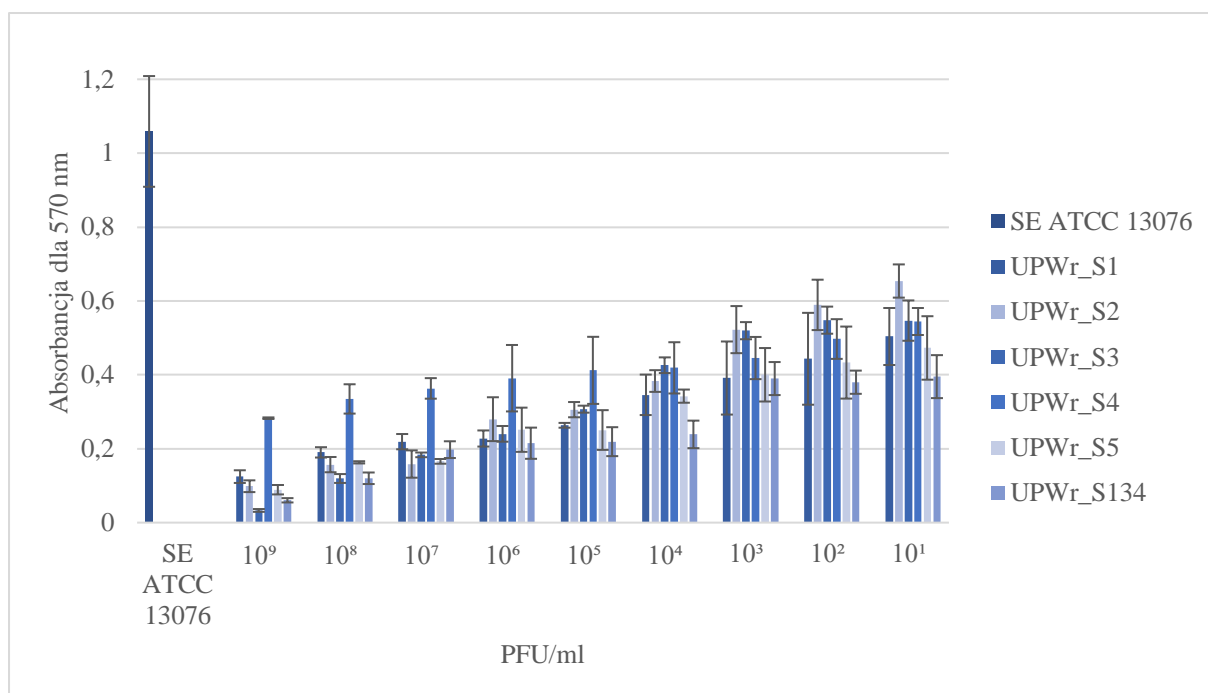
4.1.8 Degradacja biofilmu tworzonego przez *Salmonella* Enteritidis na powierzchni stali nierdzewnej

Zdolność bakteriofagów UPWr_S1-5 do redukcji bakterii w strukturach biofilmu tworzonych przez pałeczki *Salmonella* na powierzchni stali została zbadana przy użyciu podkładek pod śruby o średnicy 10 mm wykonanych ze stali nierdzewnej. Pojedyncze bakteriofagi UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 oraz koktajl UPWr_S134 niezależnie od zastosowanego miana charakteryzowały się wysoką redukcją biofilmu zarówno szczepu *S. Enteritidis* 327 lux jak i *S. Enteritidis* ATCC 13076 (Wykres 11, Wykres 12). Najwyższą efektywnością redukcji masy biofilmu obu szczepów wykazał koktajl bakteriofagów UPWr_S134. Nawet przy zastosowaniu miana 1×10^1 PFU/ml w przypadku biofilmu *S. Enteritidis* 327 lux koktajl UPWr_S134 eliminował komórki bakteryjne z biofilmu na poziomie 51%, przy czym stosując najwyższą dawkę 1×10^9 PFU/ml jego skuteczność osiągała wartość 97 %, koktajl UPWr_S134 o mianach 1×10^9 PFU/ml i 1×10^1 PFU/ml redukował biofilm *S. Enteritidis* ATCC 13076 o kolejno 94 i 62 %. Bakteriofagi UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 i koktajl UPWr_S134 wykazywały podobną skuteczność w zwalczaniu biofilmu *S. Enteritidis* 327 lux i *S. Enteritidis* ATCC 13076 ($p <$

0,05). Biofilm tworzony przez *S. Enteritidis* ATCC 13076 był w większym stopniu redukowany przez badane zawiesiny niż ten tworzony przez *S. Enteritidis* 327 lux ($p < 0,05$). Różnice w przypadku stosowania miana 1×10^9 PFU/ml mieściły się w zakresie od 3,6% większej redukcji biofilmu *S. Enteritidis* 327 lux przez koktajl UPWr_S134 w porównaniu do redukcji biofilmu *S. Enteritidis* ATCC 13076 do redukcji większej o 16% w przypadku biofilmu *S. Enteritidis* ATCC 13076 redukowanego przy pomocy bakteriofaga UPWr_S3.



Wykres 11. Redukcja biofilmu pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux tworzonych na powierzchni stali przez bakteriofagi UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 oraz koktajl UPWr_S134 o mianach w zakresie od 1×10^9 PFU/ml do 1×10^1 PFU/ml.

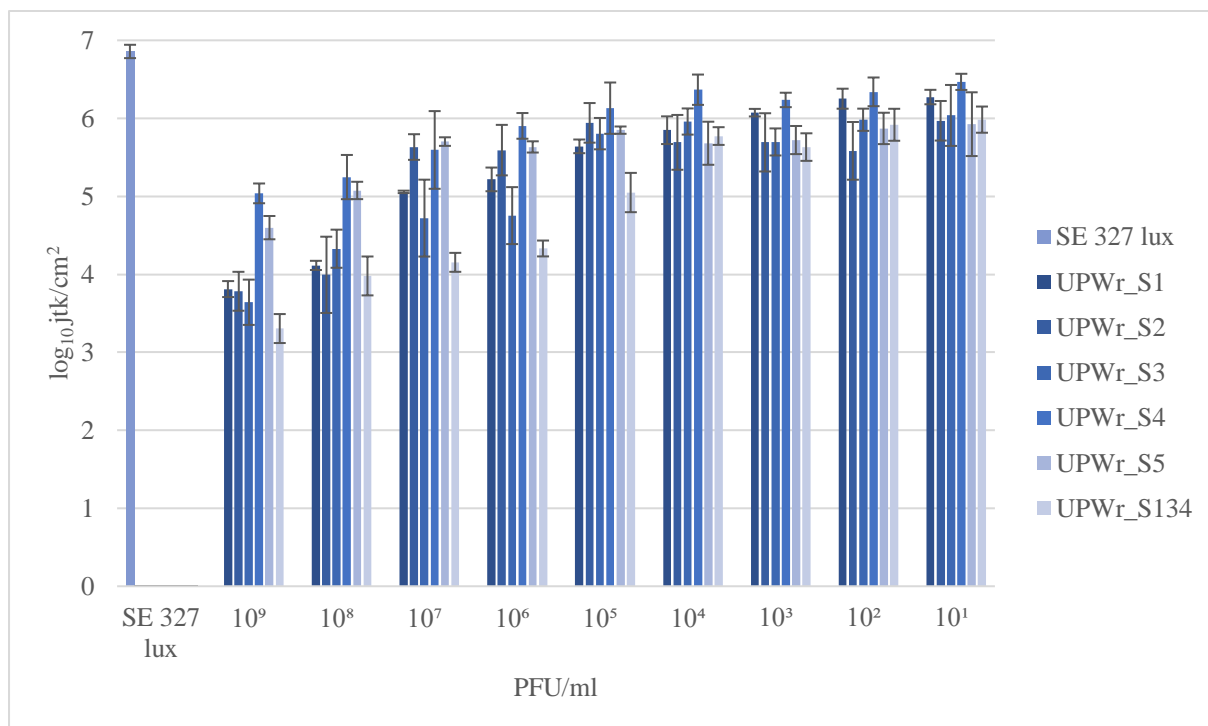


Wykres 12. Redukcja biofilmu pałeczek *S. Enteritidis* ATCC 13076 tworzonego na powierzchni stali przez bakteriofagi UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 oraz koktajl UPWr_S134 o mianach w zakresie od 1×10^9 PFU/ml do 1×10^1 PFU/ml.

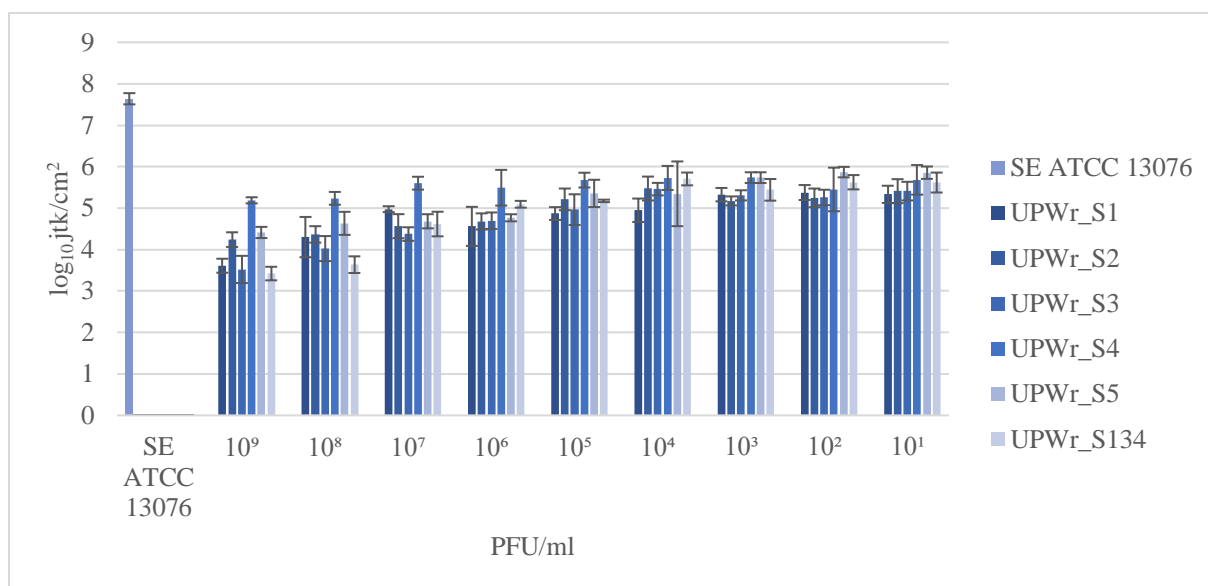
4.1.9 Redukcja biofilmu tworzonego przez pałeczki *Salmonella* Enteritidis na powierzchni liści sałaty

Skuteczność zawiesin bakteriofagów wobec biofilmu tworzonego na powierzchni liści sałaty analizowana była poprzez określenie liczby drobnoustrojów. *S. Enteritidis* ATCC 13076 utworzył biofilm na poziomie ponad $7,5 \log_{10}$ jtk/cm² w porównaniu z *S. Enteritidis* 327 lux, który wytworzył biofilm na poziomie poniżej $7 \log_{10}$ jtk/cm² (Wykres 13, Wykres 14). Liczba drobnoustrojów *S. Enteritidis* 327 lux przy zastosowaniu mian zawiesin 1×10^7 - 1×10^9 PFU/ml została obniżona do odpowiednio $5 \log_{10}$ jtk/cm² i $4 \log_{10}$ jtk/cm². Liczba drobnoustrojów na powierzchni kawałków liści utrzymywała się na poziomach odpowiednio $6 \log_{10}$ jtk/cm² i $5,5 \log_{10}$ jtk/cm² dla *S. Enteritidis* 327 lux i *S. Enteritidis* ATCC 13076 w przypadku stosowania zawiesin o mianach 1×10^1 - 1×10^5 PFU/ml. Najwyższą zdolność redukcji biofilmu zarówno *S. Enteritidis* 327 lux jak i *S. Enteritidis* ATCC 13076 wykazano w przypadku zastosowania koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 i wynosiła przy zastosowaniu miana 1×10^9 PFU/ml odpowiednio $3,55 \log_{10}$ jtk/cm² i $4,21 \log_{10}$ jtk/cm² ($p < 0,05$). *S. Enteritidis* ATCC 13076 redukowany był z powierzchni liści sałaty z większą wydajnością niż *S. Enteritidis* 327 lux. Wskazują na to m.in. wyniki największej redukcji liczby pałeczek *Salmonella*, która została

zaobserwowana przy zastosowaniu koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 o mianie 1×10^9 PFU/ml i wynosiła dla *S. Enteritidis* ATCC 13076 i *S. Enteritidis* 327 lux odpowiednio $4,22 \log_{10} \text{ jtk/cm}^2$ i $3,55 \log_{10} \text{ jtk/cm}^2$.



Wykres 13. Redukcja biofilmu pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux tworzonych na powierzchni liści sałaty przez bakteriofagi UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 oraz koktajl UPWr_S134 o mianach w zakresie od 1×10^9 PFU/ml do 1×10^1 PFU/ml.

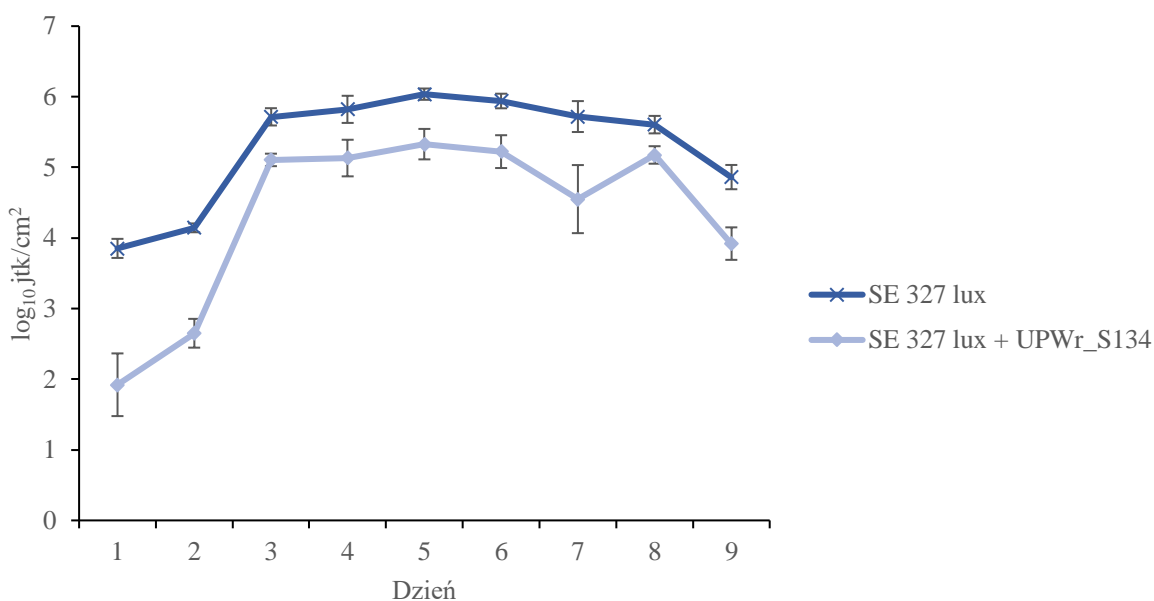


Wykres 14. Redukcja biofilmu pałeczek *S. Enteritidis* ATCC 13076 tworzonych na powierzchni liści sałaty przez bakteriofagi UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 oraz koktajl UPWr_S134 o mianach w zakresie od 10⁹ PFU/ml do 10¹ PFU/ml.

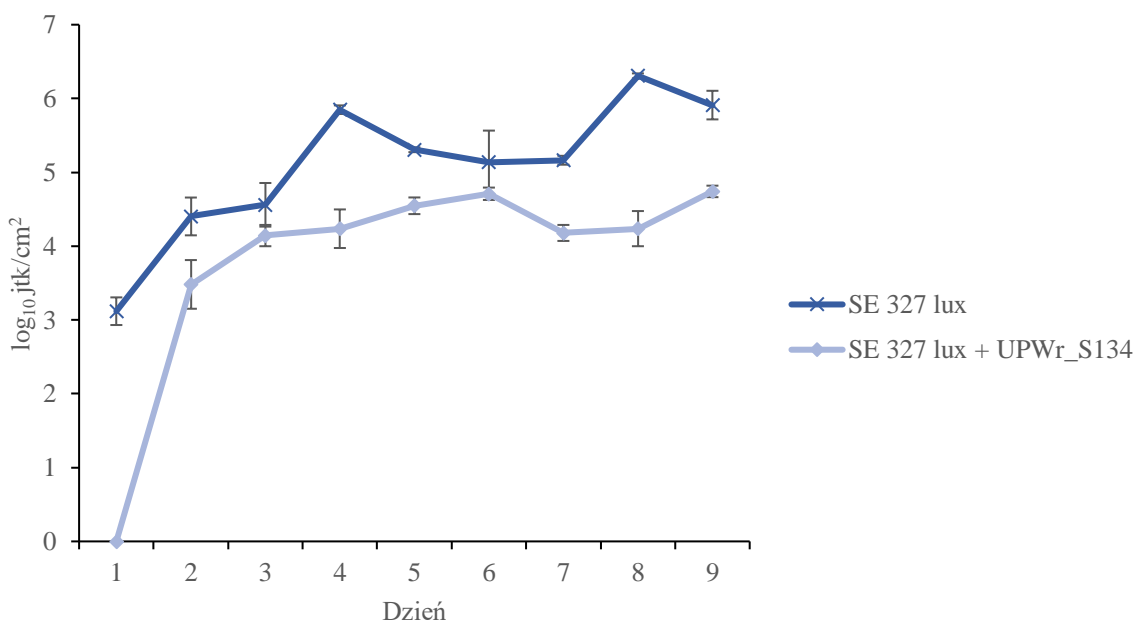
4.1.10 Redukcja liczby pałeczek *Salmonella* Enteritidis na powierzchni poidel dla drobiu w warunkach *in vitro*

Działanie koktajlu bakteriofagowego UPWr_S134 przeciwko pałeczkom *S. Enteritidis* 327 lux obecnym na powierzchni poidel dla drobiu zostało sprawdzone w warunkach laboratoryjnych. Przy wypełnieniu poidła podłożem LB, 10-krotnym rozcieńczeniu podłoża LB oraz wodą destylowaną wykazano istotny spadek liczby analizowanych drobnoustrojów we wszystkich mediach, w których obecne były bakteriofagi w porównaniu z poidłami, w których brakowało bakteriofagów ($p < 0,05$) (Wykres 15, Wykres 16, Wykres 17). W ciągu pierwszej doby trwania eksperymentu nie izolowano pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux z powierzchni poidel zawierających rozcieńczone podłoże LB oraz wodę destylowaną wraz z bakteriofagami. W poidłach, do których nie dodano koktajlu bakteriofagów, zawierających pożywkę LB oraz jej rozcieńczenie liczba pałeczek *Salmonella* była wyższa o $2 \pm 0,5 \log_{10} \text{ jtk/cm}^2$ niż w poidłach zawierających wodę destylowaną i wynosiła w obu przypadkach $6 \pm 0,5 \log_{10} \text{ jtk/cm}^2$ od 3 do 8 dnia trwania eksperymentu, przy czym w przypadku wody wartość wynosiła $4 \pm 1,5 \log_{10} \text{ jtk/cm}^2$ ($p < 0,05$). Poidła nie zawierające bakteriofagów zawierały znacząco więcej bakterii niż te, w których bakteriofagi były obecne ($p < 0,05$), wartość ta wynosiła w ciągu całego eksperymentu średnio $0,9 \log_{10} \text{ jtk/cm}^2$ dla poidel zawierających podłoże LB, $1,3 \log_{10} \text{ jtk/cm}^2$

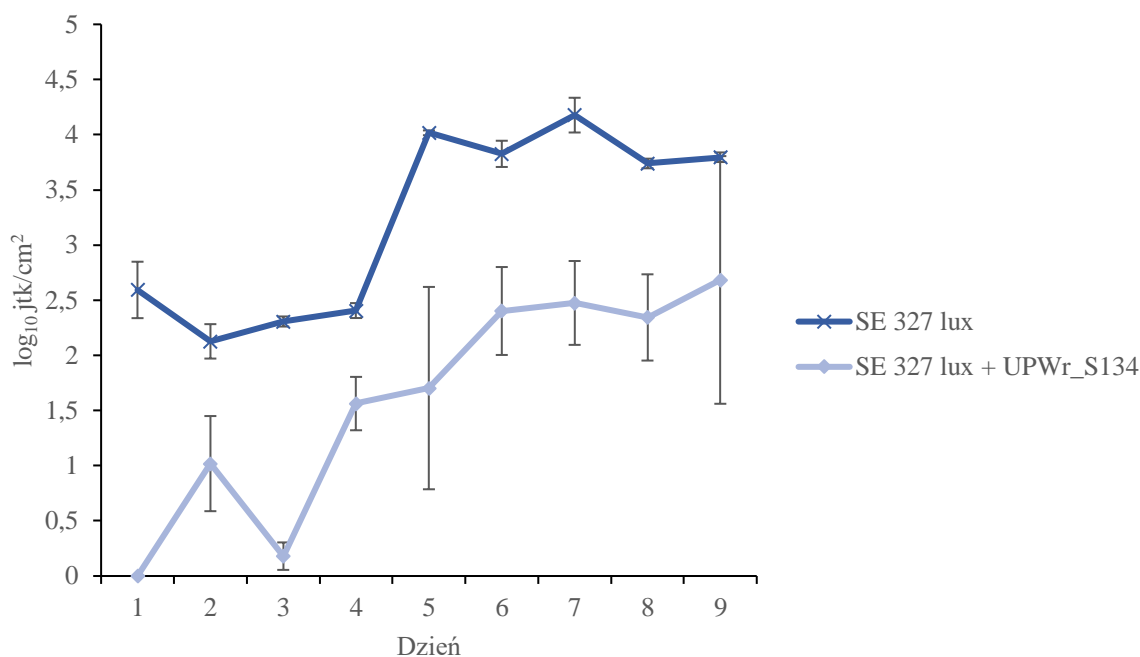
dla poideł zawierających 10-krotne rozcieńczenie podłoża LB oraz 1,6 log₁₀ jtk/cm² dla poideł zawierających wodę.



Wykres 15. Liczba pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux na powierzchni poidła dla drobiu zawierającego podłoże LB



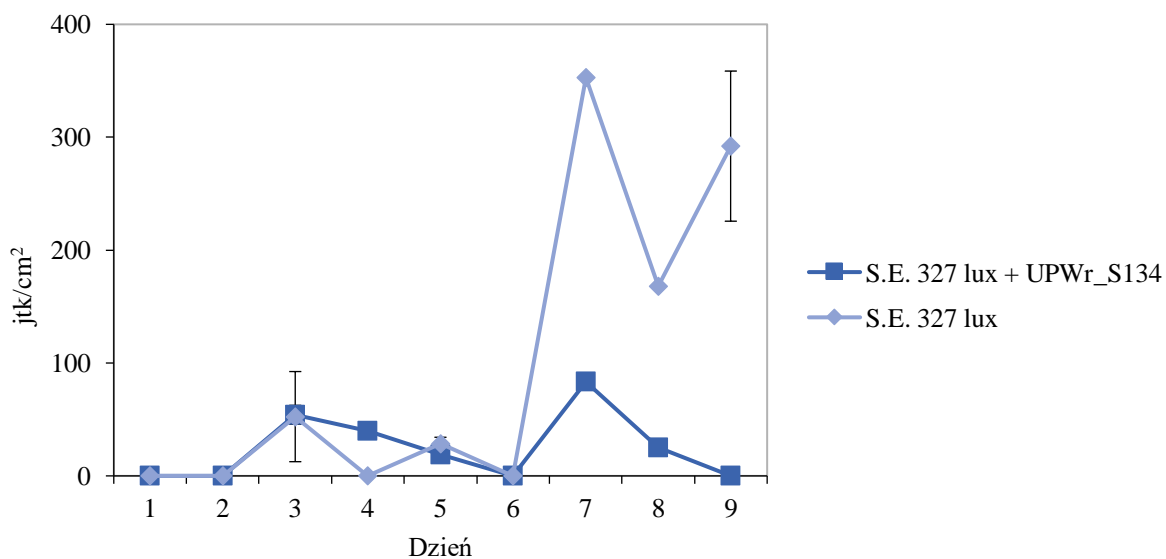
Wykres 16. Liczba pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux na powierzchni poidła dla drobiu zawierającego dziesięciokrotne rozcieńczenie podłoża LB



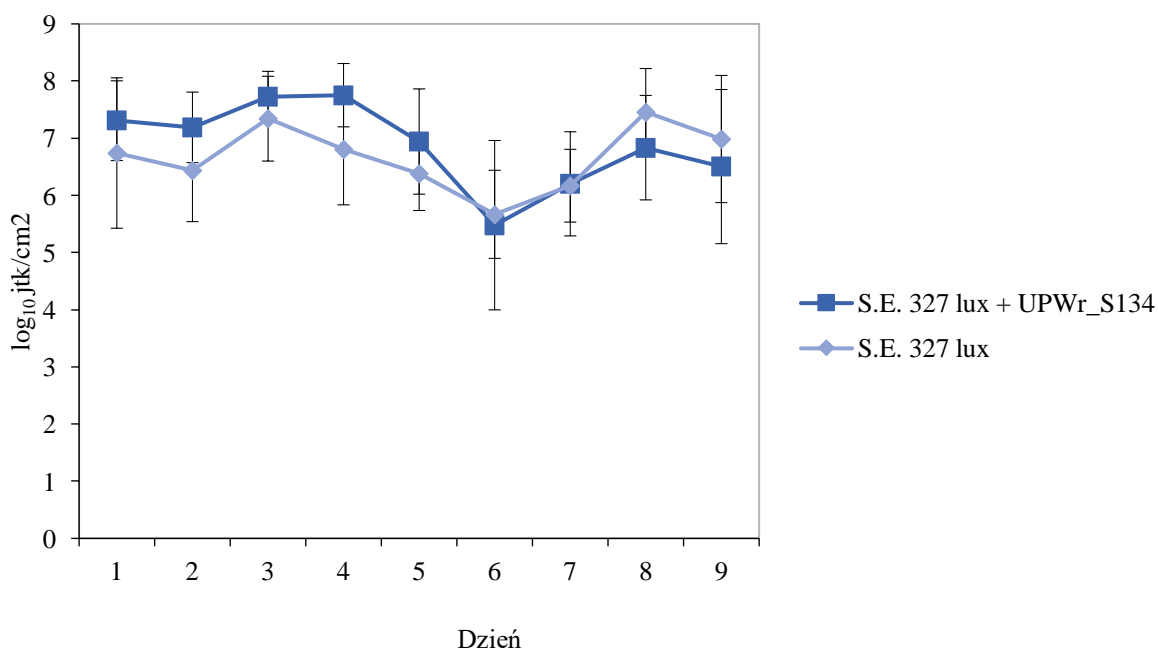
Wykres 17. Liczba pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux na powierzchni poidła dla drobiu zawierającego wodę

4.1.11 Eliminacja pałeczek *Salmonella* Enteritidis 327 lux z powierzchni poidel dla drobiu na modelu eksperymentalnie zakażonych kurcząt

W celu oznaczenia zdolności koktajlu bakteriofagowego UPWr_S134 do eliminowania pałeczek *S. Enteritidis* obecnych w biofilmie tworzonym na powierzchni poidel dla drobiu (Wykres 18) podczas odchowu brojlerów przeprowadzono badania na modelu eksperymentalnie zakażonych kurcząt. Ogólna liczba drobnoustrojów (Wykres 19) nie różniła się w sposób znaczący pomiędzy grupą 1, której woda pitna zawierała pałeczki *S. Enteritidis* 327 lux i grupą 3, gdzie do wody pitnej dodano pałeczki *S. Enteritidis* 327 lux i koktajl bakteriofagów UPWr_S134, wynosząc odpowiednio 5,6-7,5 log₁₀ jtk/cm² i 5,5-7,8 log₁₀ jtk/cm² w ciągu 9 dni trwania eksperymentu ($p < 0,05$). W grupie 3 liczba pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux w trakcie trwania eksperymentu wynosiła maksymalnie 1,92 log₁₀ jtk/cm². Dziewiątego dnia trwania pomiarów nie wykryto w grupie 3 pałeczek *Salmonella*. W przypadku grupy 1 ptaków, liczba tych izolowanych patogenów osiągnęła maksymalną wartość 2,55 log₁₀ jtk/cm², a ostatniego dnia eksperymentu wynosiła 2,47 log₁₀ jtk/cm².



Wykres 18. Liczba pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux na powierzchni poidła dla drobiu

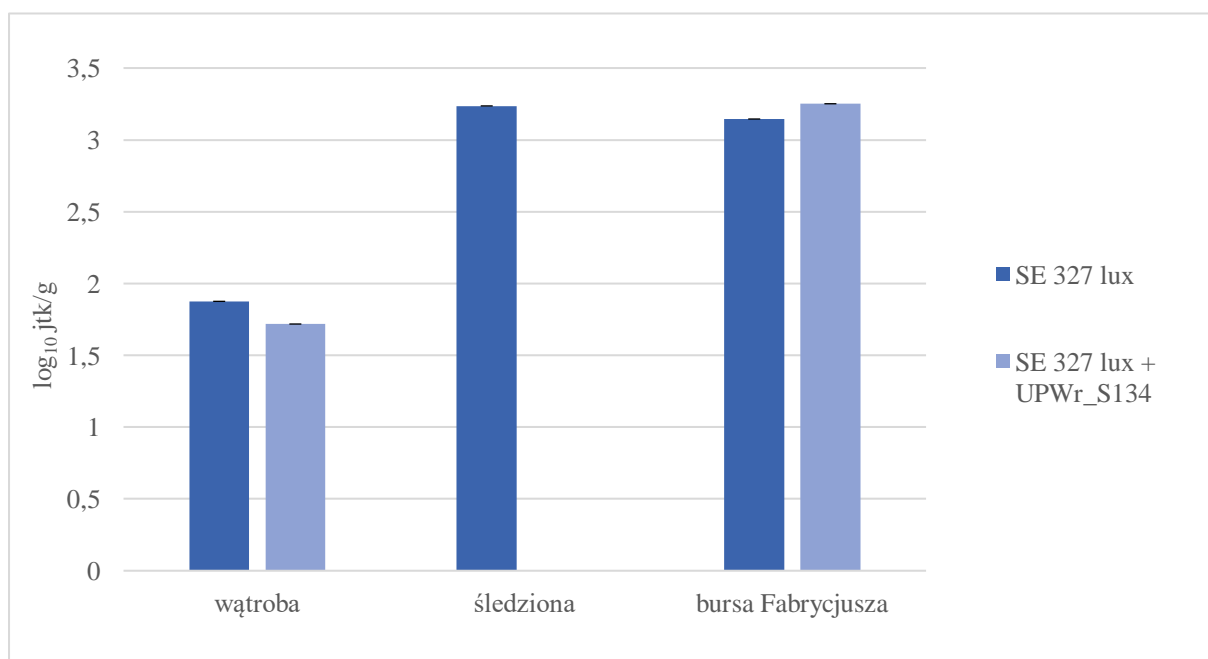


Wykres 19. Ogólna liczba drobnoustrojów powierzchni poidła dla drobiu

4.1.12 Redukcja liczby pałeczek *Salmonella* Enteritidis 327 lux w narządach eksperymentalnie zakażonych kurcząt

9 dnia trwania eksperymentu kurczęta poddano eutanazji. W narządach wewnętrznych kurcząt z grupy 1, którym podawano wodę wraz z pałeczkami *S. Enteritidis* 327 lux oraz kurcząt z grupy 3, którym podawano wodę zawierającą koktajl UPWr_S134 i pałeczki *S. Enteritidis*

327 lux oznaczano liczby pałeczek *Salmonella* oraz miana bakteriofagów w narządach takich jak wątroba, bursa Fabrycjusza oraz śledziona. (rozd. 3.2.2, rozdz. 3.2.4, rozdz. 3.2.5). U ptaków ze wszystkich grup nie wykazano objawów salmonelozy i nie wykazano u nich żadnych zmian anatomopatologicznych. U kurcząt z grupy 2, którym wraz z wodą pitną podawano koktajl bakteriofagów oraz z grupy 4, którym nie podawano dodatków do wody pitnej nie izolowano pałeczek *Salmonella*. U ptaków z grupy 1, w próbkach burs Fabrycjusza, wykazano obecność bakterii patogennych u 8 na 10 sztuk kurcząt (Tabela 9), przy średniej ich liczbie $3,2 \pm 0,2 \log_{10}$ jtk/g, co stanowiło wyższą wartość niż u grupy 3, gdzie wykryto obecność patogenów jedynie w 2 na 10 narządów, przy średniej liczbie tych drobnoustrojów wynoszącej $3,1 \pm 0,4 \log_{10}$ jtk/g ($p < 0,05$) (Wykres 20). Liczby pałeczek *Salmonella* w próbkach wątrób i śledzion badanych kurcząt nie różniła się w istotnym stopniu między grupami zakażanymi pałeczkami *Salmonella* bez względu na obecność koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 ($p < 0,05$). Jednakże, u grupy 1 liczba zakażonych narządów w przypadku wątroby była znacznie wyższa niż w grupie 3 i wynosiła 50% ze średnią liczbą bakterii $2,0 \pm 0,71 \log_{10}$ jtk/g, natomiast w grupie 3 wartości te wynosiły odpowiednio 30% i $1,4 \pm 0,60 \log_{10}$ jtk/g. W przypadku próbek pobranych ze śledzion u grupy 3, nie wykryto obecności pałeczek *Salmonella*, natomiast w grupie 1 u 3 z 10 narządów wykryto obecność tych drobnoustrojów przy średniej liczbie $3,2 \pm 0,82 \log_{10}$ jtk/g.



Wykres 20. Liczba pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux w narządach kurcząt

Tabela 9. Liczba zakażonych organów kurcząt

Grupa kurcząt/narząd	wątroba	śledziona	bursa Fabrycjusza
III	5	3	8
I	3	0	2

4.2 Ocena zdolności bakteriofagi UPWr_E1-4 do redukcji patogennych dla drobiu *E. coli*

4.2.1 Namnażanie bakteriofagów UPWr_E1-4

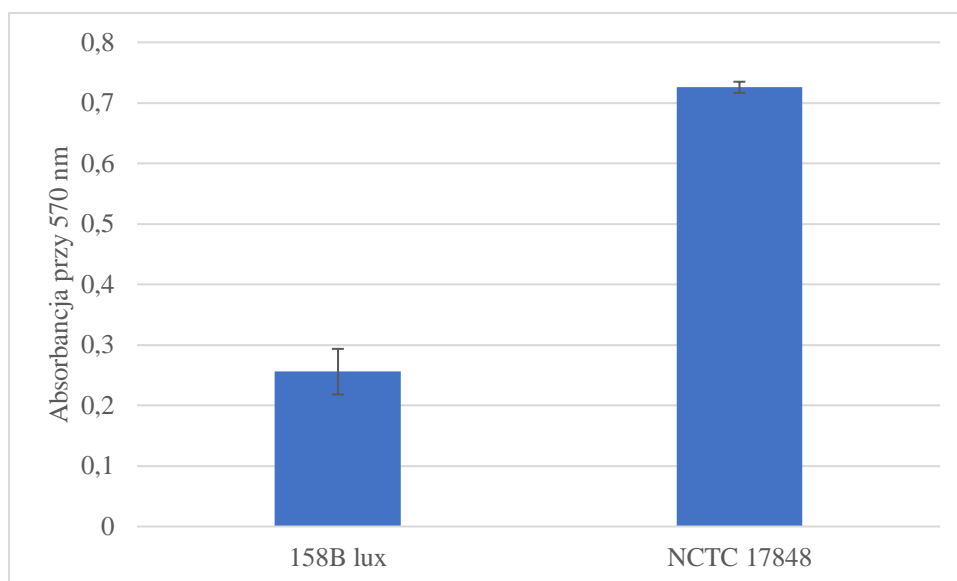
W wyniku dwustopniowego namnażania bakteriofagów UPWr_E1-4 otrzymano zawiesiny bakteriofagów o mianach od $4,62 \times 10^9$ PFU/ml w przypadku faga UPWr_E3 do $3,4 \times 10^{12}$ PFU/ml i $1,72 \times 10^{12}$ PFU/ml uzyskanego dla zawiesin fagów UPWr_E2 i UPWr_E4. Miano zawiesiny UPWr_E1 osiągnęło wartość $9,25 \times 10^{11}$ PFU/ml (Tabela 10).

Tabela 10. Miana zawiesin bakteriofagów UPWr_E1-4

Nazwa Bakteriofaga	Miano [PFU/ml]
UPWr_E1	$9,25 \times 10^{11}$
UPWr_E2	$1,72 \times 10^{12}$
UPWr_E3	$4,62 \times 10^9$
UPWr_E4	$3,4 \times 10^{12}$

4.2.2 Zdolność tworzenia biofilmu przez szczepy APEC

Zdolność tworzenia biofilmu przez szczepy *E. coli* ustalono według skali przedstawionej wcześniej w rozdziale 3.2.13.3. *E. coli* 158B lux wytworzył biofilm na poziomie $OD_{570} = 0,404$, co klasyfikuje go jako średniego producenta biofilmu, natomiast *E. coli* NCTC 17848 wytworzył biofilm na poziomie $OD_{570} = 0,875$, i został sklasyfikowany jako silny producenta biofilmu. Wykazano, że *E. coli* NCTC 17848 wytworzył około 4 razy większy biofilm niż *E. coli* 158B lux (Wykres 21).

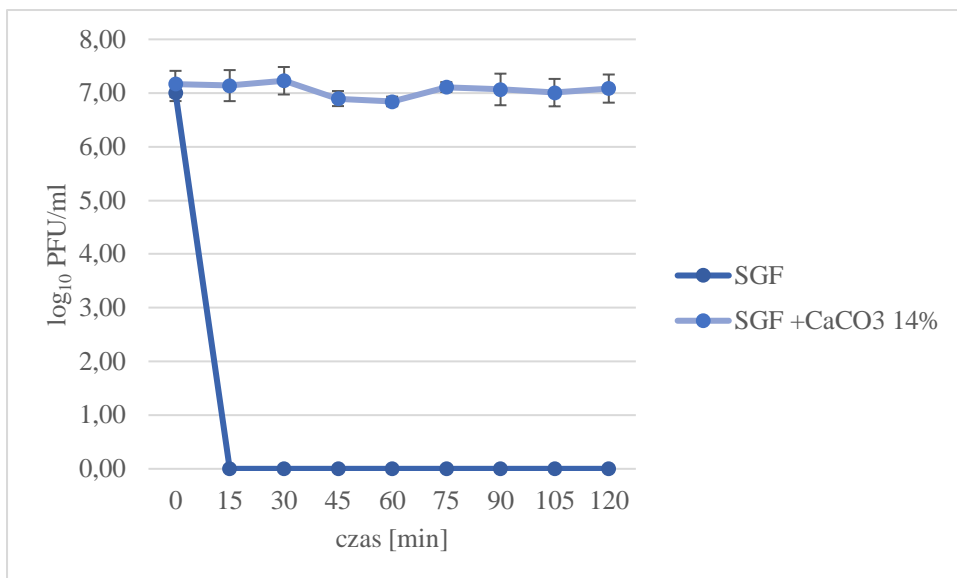


Wykres 21. Biofilm tworzony przez patogenne dla drobiu *E. coli*

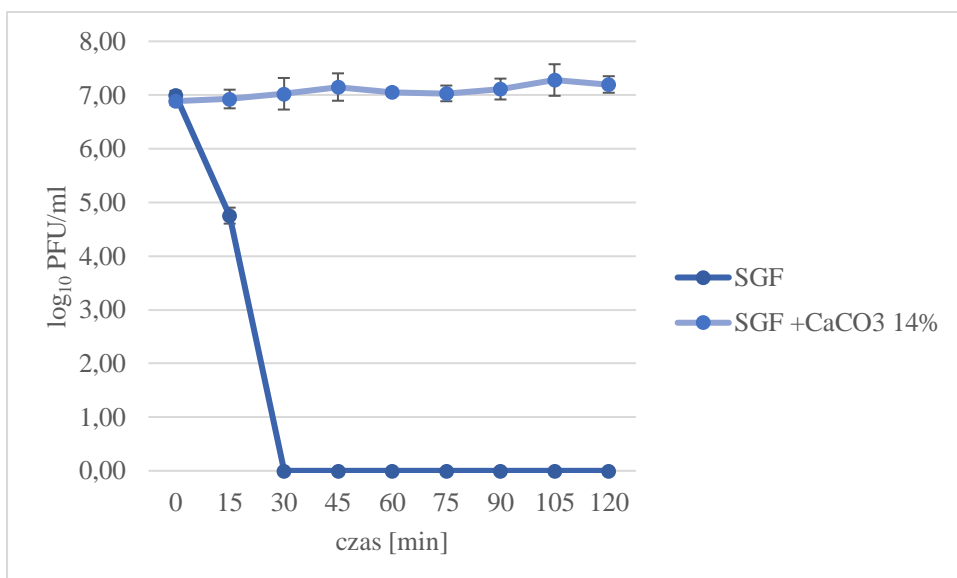
4.2.3 Aktywność bakteriofagów UPWr_E1-4 w środowisku symulowanego kwasu żołądkowego kurcząt SGF

W badaniach *in vitro* w środowisku symulowanego soku żołądkowego kurcząt zaobserwowano całkowitą inaktywację bakteriofagów UPWr_E1 z wartości początkowych $7 \log_{10}$ PFU/ml do zera po 15 minutach inkubacji, dla bakteriofagów UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 i koktajlu UPWr_E124 wykazano spadek miana z wartości początkowych $7 \log_{10}$ PFU/ml do odpowiednio $4,8 \log_{10}$ PFU/ml, $4,7 \log_{10}$ PFU/ml, $3,7 \log_{10}$ PFU/ml i $4,5 \log_{10}$ PFU/ml w ciągu pierwszych 15 minut inkubacji. Po 30 minutach inkubacji bakteriofagi UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 i koktajl UPWr_E124 całkowicie straciły swoją aktywność (Wykres 22-26).

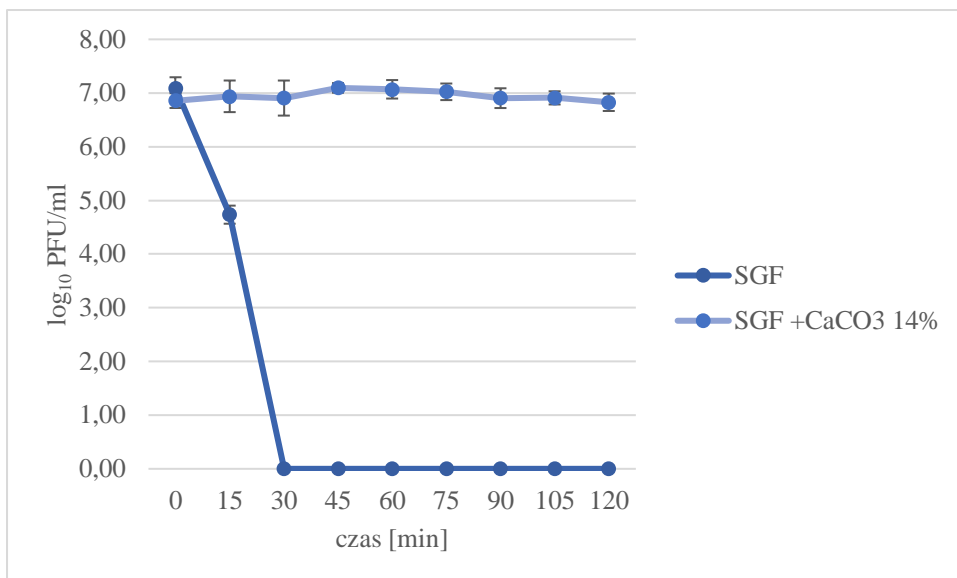
Podczas inkubacji bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajlu UPWr_E124 w buforze SGF z dodatkiem 14% CaCO_3 nie wykazano istotnego ($p < 0,05$) spadku miana zawiesin w trakcie inkubacji. Miano zawiesin utrzymywało się na poziomie $7 \pm 0,2 \log_{10}$ PFU/ml przez cały dwugodzinny okres trwania inkubacji (Wykres 22-26).



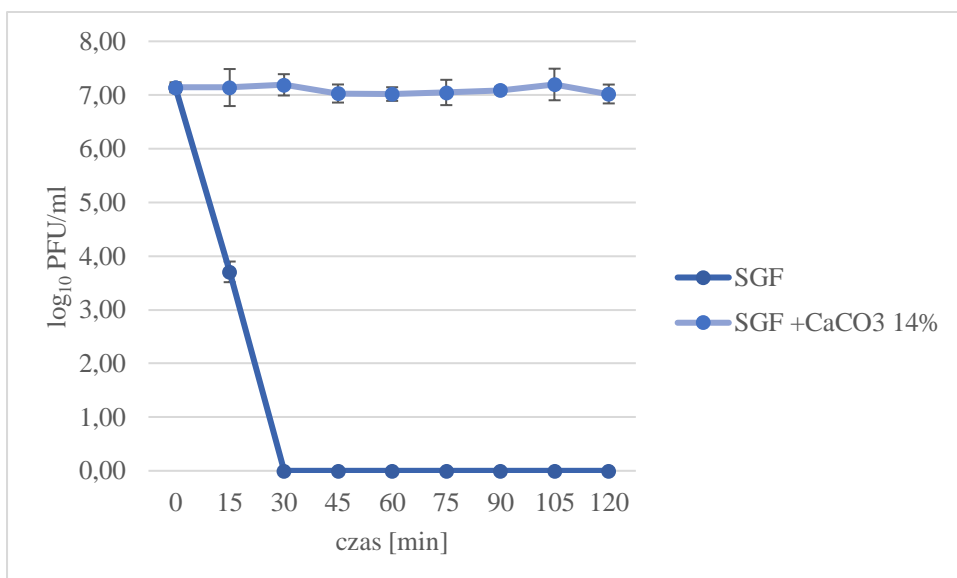
Wykres 22. Miano bakteriofaga UPWr_E1 w buforze SGF



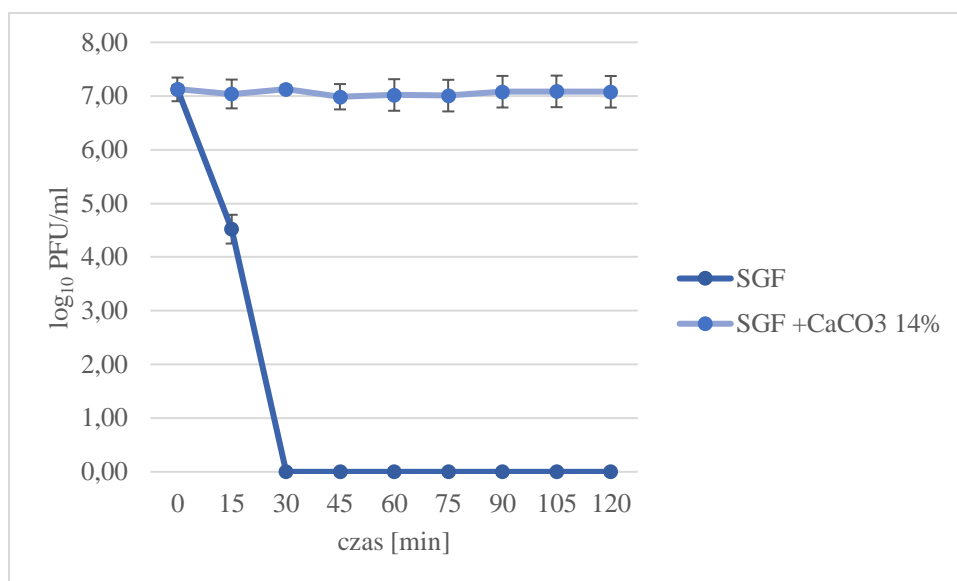
Wykres 23. Miano bakteriofaga UPWr_E2 w buforze SGF



Wykres 24. Miano bakteriofaga UPWr_E3 w buforze SGF



Wykres 25. Miano bakteriofaga UPWr_E4 w buforze SGF

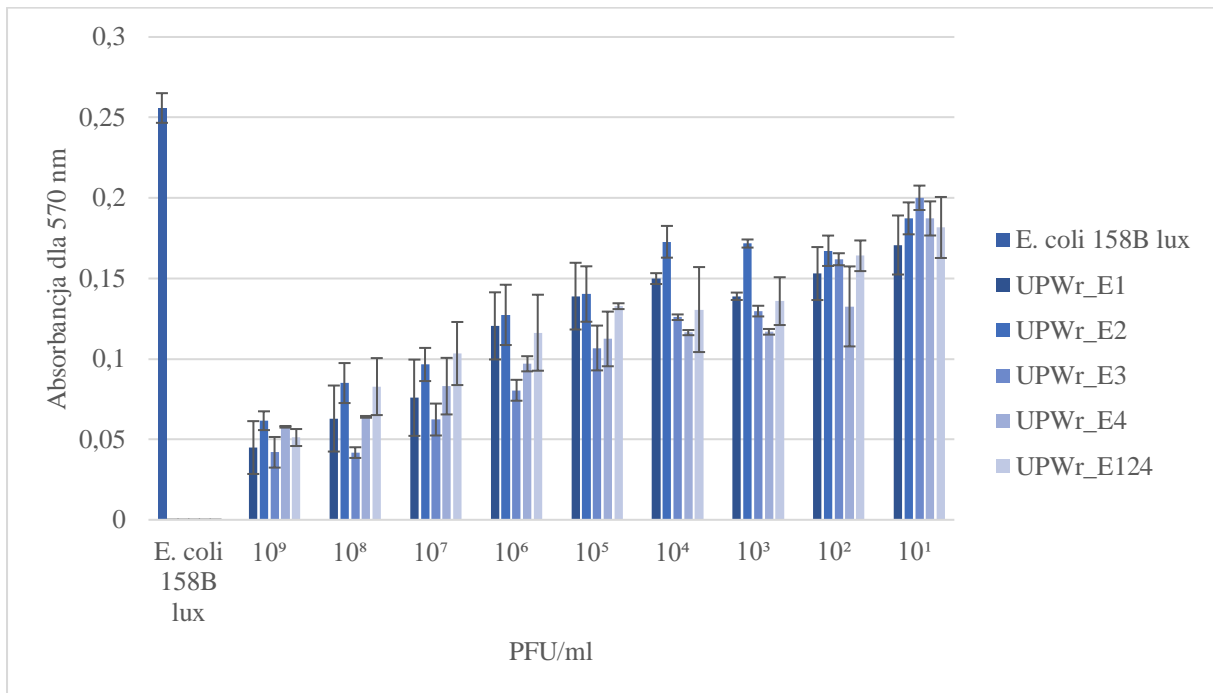


Wykres 26. Miano koktajlu bakteriofagów UPWr_E124 w buforze SGF

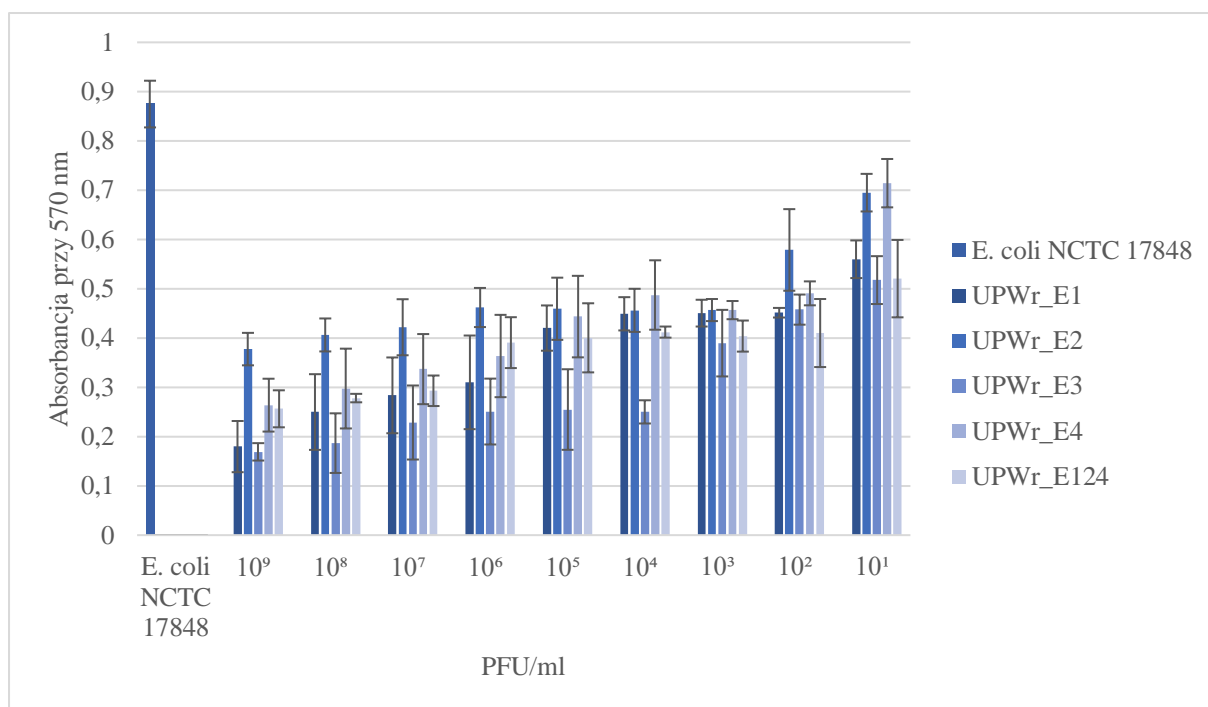
4.2.5 Degradacja biofilmu tworzonego przez patogenne dla drobiu *Escherichia coli* na powierzchni płytek 96-dółkowych

Zbadano aktywność bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 i koktajlu UPWr_E124 przeciwko biofilmom utworzonym przez *E. coli* 158B lux i *E. coli* NCTC 17848 na powierzchni płytek 96-dółkowych. Dla szczepu *E. coli* NCTC 17848 charakteryzującego się wysoką zdolnością tworzenia biofilmu (rozdz. 4.2.2) zaobserwowana redukcja wielkości biofilmu była statystycznie istotna w przypadku biofilmu obydwu wykorzystanych szczepów bakterii ($p < 0,05$) niezależnie od zastosowanego miana zawiesin bakteriofagów (Wykres 27, Wykres 28). Redukcja biofilmu tworzonego przez *E. coli* 158B lux przy zastosowaniu bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajlu UPWr_E124 o mianie 1×10^9 PFU/ml nie różniła się w sposób znaczący niezależnie od analizowanego bakteriofaga i wynosiła od 76% dla bakteriofaga UPWr_E4 do 84% dla bakteriofaga UPWr_E3 ($p < 0,05$). Stosując miano 1×10^9 PFU/ml zawiesin bakteriofagów wobec biofilmu *E. coli* NCTC 17848 osiągnięto redukcję biofilmu w zakresie od 56% dla bakteriofaga UPWr_E2 do 80% uzyskanych przy użyciu bakteriofaga UPWr_E3. Przy zastosowaniu najniższego miana zawiesin 1×10^1 PFU/ml wykazano redukcję biofilmu *E. coli* 158B lux dla wszystkich bakteriofagów, osiągając wartości w zakresie od 21% dla bakteriofaga UPWr_E3 do 33% dla bakteriofaga UPWr_E1. W przypadku redukcji biofilmu *E. coli* NCTC 17848 wykazano redukcję przy pomocy bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E3

oraz koktajlu UPWr_E124 o wartościach odpowiednio 36%, 40% i 41%, natomiast zawiesiny UPWr_E2 i UPWr_E4 redukowały biofilm o odpowiednio 21% i 18%.



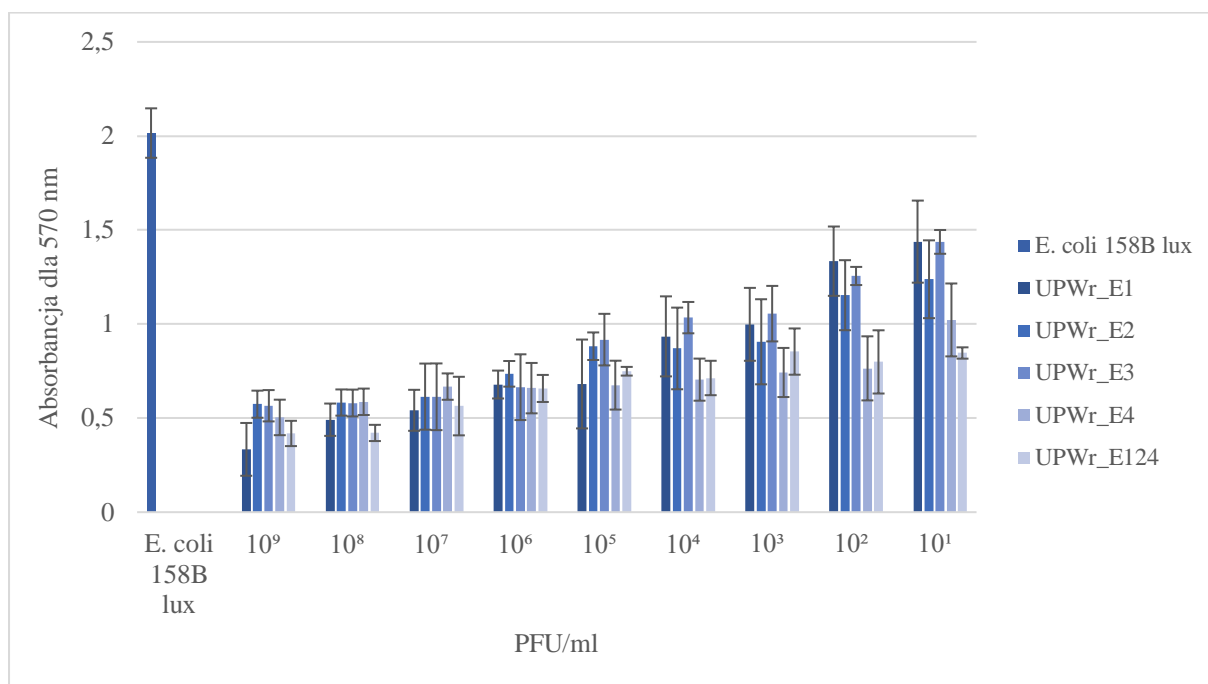
Wykres 27. Redukcja biofilmu *E. coli* 158B lux tworzego na powierzchni płytek 96-dółkowych przez bakteriofagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajl UPWr_E124 o mianach w zakresie od 1 x 10⁹ PFU/ml do 1 x 10¹ PFU/ml.



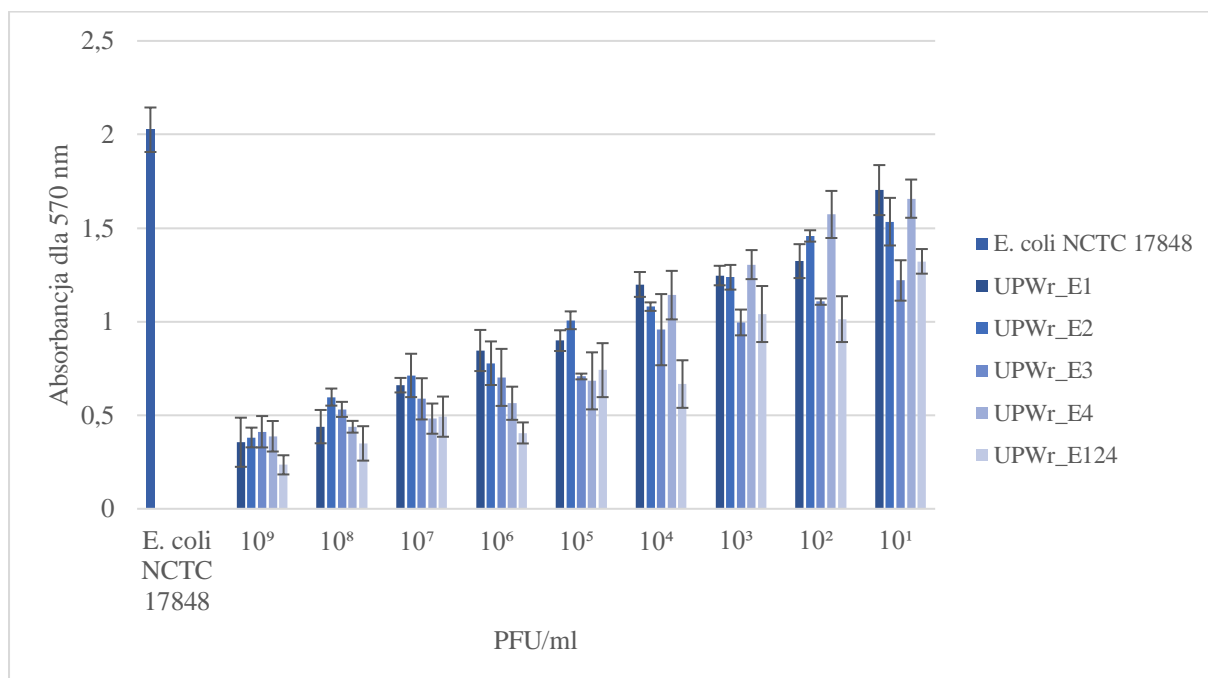
Wykres 28. Redukcja biofilmu *E. coli* NCTC 17848 tworzonego na powierzchni płytek 96-dółkowych przez bakteriofagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajl UPWr_E124 o mianach w zakresie od 1×10^9 PFU/ml do 1×10^1 PFU/ml.

4.2.6 Degradacja biofilmu tworzonego przez patogenne dla drobiu *Escherichia coli* na powierzchni stali nierdzewnej

Analizowano zdolność bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajlu UPWr_E124 do redukcji biofilmu *E. coli* 158B lux i *E. coli* NCTC 17848 na powierzchni stali nierdzewnej w postaci podkładek pod śruby. Nie wykazano istotnej różnicy między wielkością biofilmu tworzonego przez *E. coli* 158B lux oraz *E. coli* NCTC 17848 ($p < 0,05$). Zaobserwowano znaczną skuteczność bakteriofagów w eradykacji biofilmu, osiągając wartości w zakresie od 64-88% przy mianach 1×10^7 - 1×10^9 PFU/ml dla obu szczepów bakteryjnych oraz wszystkich analizowanych bakteriofagów ($p < 0,05$). Przy stosowaniu najniższego miana bakteriofagów 1×10^1 PFU/ml wykazano redukcję biofilmu *E. coli* 158B lux od 29% dla bakteriofaga UPWr_E1 do 58% dla koktajlu bakteriofagów UPWr_E124. Bakteriofagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E4 o mianie 1×10^1 PFU/ml zredukowały biofilm *E. coli* NCTC 17848 o odpowiednio 15%, 24 % i 18%, natomiast bakteriofag UPWr_E3 oraz koktajl bakteriofagów UPWr_E124 zredukowały ten biofilm o odpowiednio 40% i 35% (Wykres 29, Wykres 30).



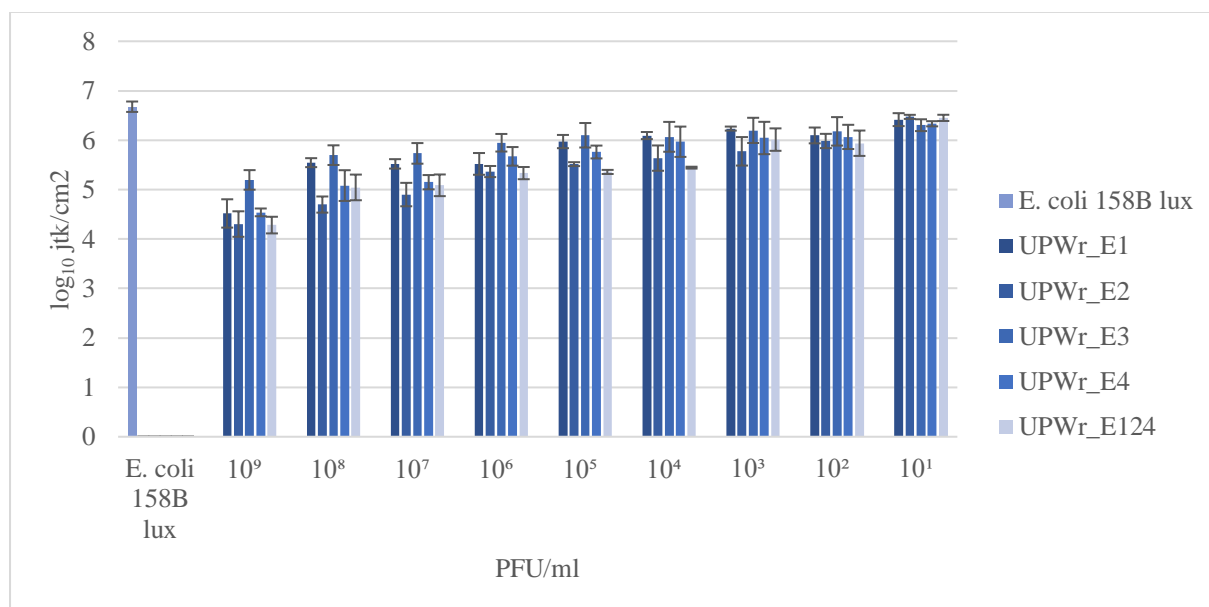
Wykres 29. Redukcja biofilmu *E. coli* 158B lux tworzonego na powierzchni stali przez bakteriofagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajl UPWr_E124 o mianach w zakresie od 1 x 10⁹ PFU/ml do 1 x 10¹ PFU/ml.



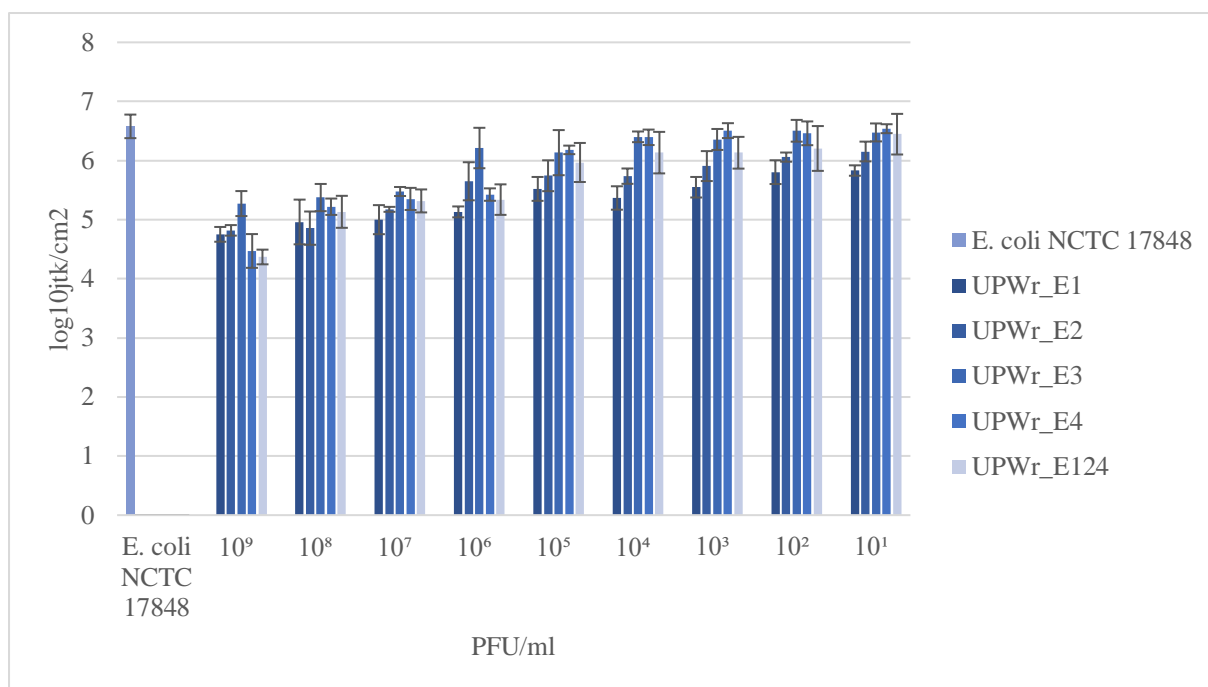
Wykres 30. Redukcja biofilmu *E. coli* NCTC 17848 tworzonego na powierzchni stali przez bakteriofagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajl UPWr_E124 o mianach w zakresie od 1 x 10⁹ PFU/ml do 1 x 10¹ PFU/ml.

4.2.7 Redukcja biofilmu tworzonego przez patogenne dla drobiu *Escherichia coli* na powierzchni liści sałaty

Skuteczność bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajlu UPWr_E124 wobec biofilmu tworzonego przez *E. coli* 158B lux i *E. coli* NCTC 17848 na liściach sałaty analizowano poprzez określenie liczby drobnoustrojów. Tworzony przez *E. coli* 158B lux oraz *E. coli* NCTC 17848 biofilm nie różnił się znacząco liczbą żywych komórek drobnoustrojów, która wynosiła odpowiednio $6,7 \log_{10}$ jtk/cm² i $6,6 \log_{10}$ jtk/cm² ($p < 0,05$) (Wykres 31, Wykres 32). Bakteriofagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajl UPWr_E124 o mianach 1×10^7 - 1×10^9 PFU/ml zmniejszały liczbę bakterii *E. coli* 158B lux o 16-33%, a *E. coli* NCTC 17848 o 14-35%, przy czym w obu przypadkach minimalne wartości tych zakresów zostały uzyskane przy użyciu bakteriofaga UPWr_E3, a najwyższe przy użyciu koktajlu bakteriofagów UPWr_E124. Zastosowanie najniższego miana bakteriofagów, 1×10^1 PFU/ml skutkowało brakiem znaczącej redukcji liczby obu analizowanych drobnoustrojów ($p < 0,05$).



Wykres 31. Redukcja biofilmu *E. coli* 158B lux tworzonego na powierzchni sałaty przez bakteriofagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajl UPWr_E124 o mianach w zakresie od 1×10^9 PFU/ml do 1×10^1 PFU/ml.

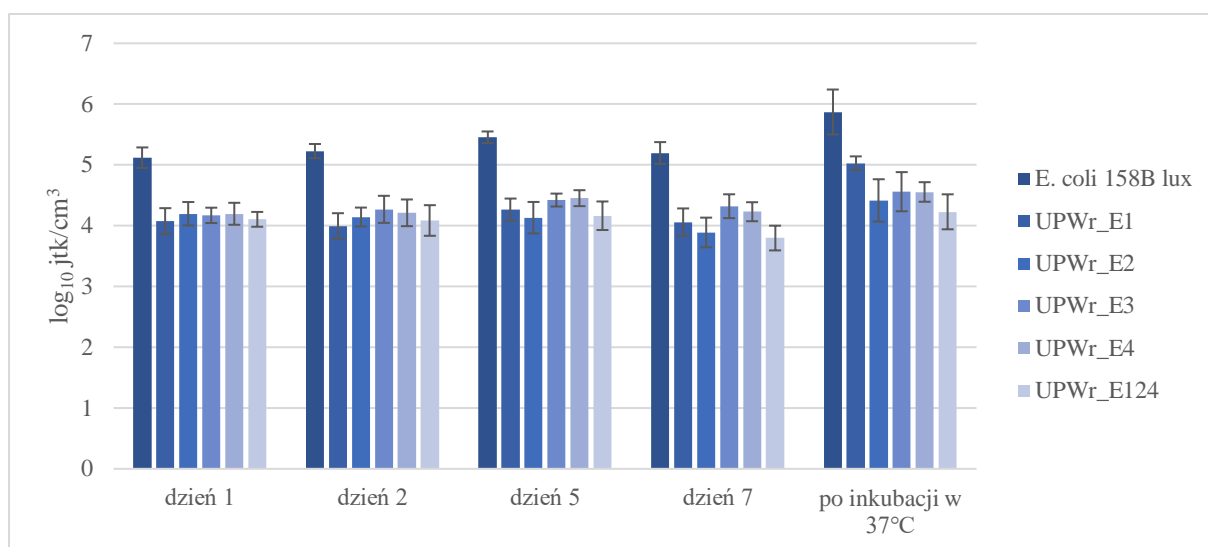


Wykres 32. Redukcja biofilmu *E. coli* NCTC 17848 tworzego na powierzchni sałaty przez bakteriofagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajl UPWr_E124 o mianach w zakresie od 1×10^9 PFU/ml do 1×10^1 PFU/ml.

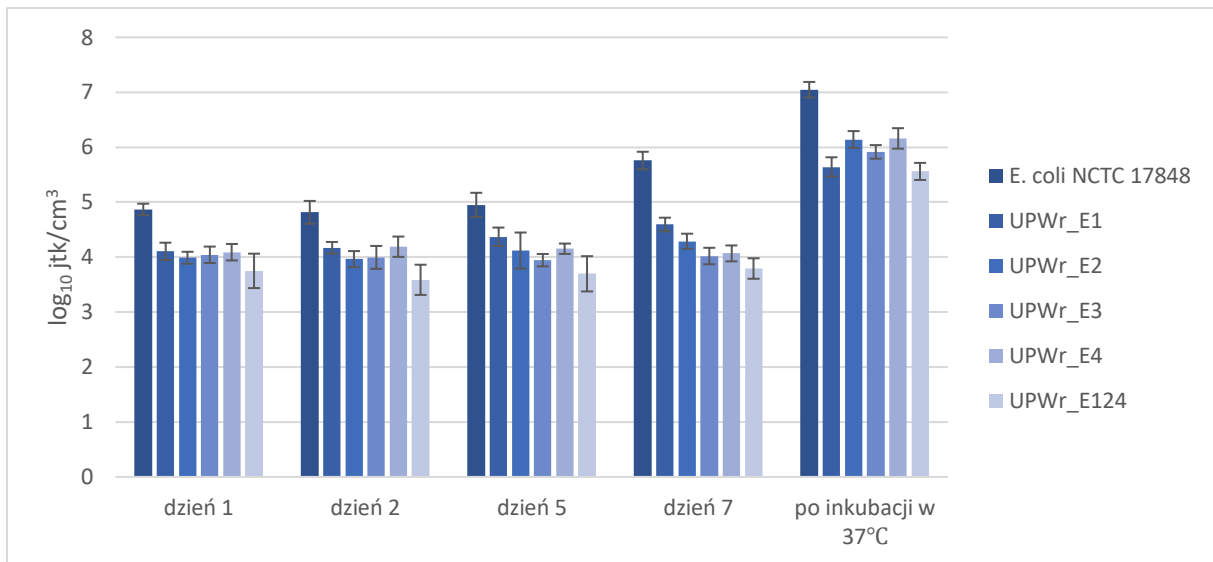
4.2.8 Redukcja biofilmu tworzego przez *Escherichia coli* na powierzchni mięsa drobiowego

Oznaczono zdolność bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajlu UPWr_E124 do redukcji liczby bakterii *E. coli* 158 B lux i *E. coli* NCTC 17848 w biofilmie na powierzchni mięsa drobiowego. Liczba *E. coli* 158B lux i *E. coli* NCTC 1784 przez 7 dni inkubacji nie zmieniła się w sposób istotny i wynosiła $5,3 \pm 0,2 \log_{10} \text{ jtk/cm}^3$ ($p < 0,05$) (Wykres 33). Liczba *E. coli* NCTC 17848 utrzymywała się na poziomie $4,8 \pm 0,1 \log_{10} \text{ jtk/cm}^3$ przez pierwsze 5 dni trwania eksperymentu, siódmego dnia inkubacji wzrosła do wartości $5,8 \log_{10} \text{ jtk/cm}^3$ (Wykres 34). Liczba *E. coli* 158B lux na powierzchni kawałków fileta drobiowego, które umieszczono w zawieszynie bakteriofagów o mianie 1×10^9 PFU/ml po umieszczeniu ich w zawieszynie bakterii *E. coli* 158 B lux o stężeniu 2×10^8 jtk/ml była niższa w porównaniu z kawałkami nie traktowanymi bakteriofagiem i wynosiła $4,1 \pm 0,3 \log_{10} \text{ jtk/cm}^3$ ($p < 0,05$). Podobne wartości zaobserwowano dla *E. coli* NCTC 17848, liczba tych drobnoustrojów na kawałkach zanurzonych uprzednio w bakteriofagach nie uległa zmianie przez 7 dni trwania inkubacji i utrzymywała się na poziomie $4,1 \pm 0,5 \log_{10} \text{ jtk/cm}^3$ ($p < 0,05$).

Po 7-dniowej inkubacji w warunkach chłodniczych kawałki mięsa drobiowego inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny. Wzrost liczby drobnoustrojów w kawałkach zanurzonych uprzednio w bakteriofagach w przypadku *E. coli* 158 B lux był na poziomie 0,7 log₁₀ jtk/cm³ i wynosił 5,9 log₁₀ jtk/cm³, dla *E. coli* NCTC 17848 wzrost liczby drobnoustrojów był na poziomie 1,3 log₁₀ jtk/cm³ i wynosił 7,1 log₁₀ jtk/cm³. U *E. coli* 158 B lux, wzrost drobnoustrojów został zahamowany na poziomie 4,4 ± 0,2 log₁₀ jtk/cm³ przez bakteriofagi UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajl UPWr_E124. W przypadku kawałków zanurzonych przed rozpoczęciem inkubacji w bakteriofagu UPWr_E1 zaobserwowano wzrost liczby drobnoustrojów z 4 log₁₀ jtk/cm³ do 5 log₁₀ jtk/cm³ (Wykres 33, Wykres 34). Wzrost *E. coli* NCTC 17848 nie został zahamowany jak w przypadku *E. coli* 158 B lux, liczba drobnoustrojów w kawałkach traktowanych bakteriofagami po inkubacji w 37°C osiągnęła wartość 5,9 ± 0,3 log₁₀ jtk/cm³.



Wykres 33. Redukcja biofilmu *E. coli* NCTC 17848 tworzonego na powierzchni mięsa drobiowego przez bakteriofagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajl UPWr_E124 o mianie 1 x 10⁹ PFU/ml



Wykres 34. Redukcja liczby *E. coli* NCTC 17848 w biofilmie tworzonym na powierzchni mięsa drobiowego przez bakteriofagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajl UPWr_E124 o mianie 1×10^9 PFU/ml

5. Dyskusja

Narastająca lekooporność bakterii patogennych, przyczynia się do poszukiwania alternatywnych metod ich eliminowania, a bakteriofagi stanowią obiecującą alternatywę dla chemioterapeutyków.

Biofilmy tworzone przez patogeny stanowią znaczne zagrożenie dla zdrowia zarówno człowieka jak i zwierząt hodowlanych ze względu na to, że są rezerwuarem bakterii chorobotwórczych wykazującym wysoką oporność na działanie środków chemicznych i mechanicznych. Biofilmy porastają zarówno powierzchnie biotyczne takie jak liście roślin czy mięso, jak i abiotyczne takie jak plastik czy stal, stanowiąc potencjalne źródło patogenów w produkcji żywności (Patel i Sharma, 2010; Simões i in., 2010; Montso i in., 2021).

W niniejszej pracy analizowano skuteczność bakteriofagów przeciwko biofilmom tworzonym przez pałeczki *S. Enteritidis* na powierzchni płytek wielodołkowych, stali nierdzewnej, liści sałaty i powierzchni poidel dla drobiu oraz patogennych dla drobiu *E. coli* na powierzchni płytek wielodołkowych, stali nierdzewnej, liści sałaty i mięsa drobiowego.

5.1 Rola bakteriofagów w zwalczaniu biofilmu tworzonego przez *S. Enteritidis*

Do badań nad zdolnością bakteriofagów do zwalczania biofilmu tworzonego przez pałeczki *Salmonella* wykorzystano bakteriofagi UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4 oraz UPWr_S5 wcześniej szczegółowo scharakteryzowano w literaturze (Kuźmińska-Bajor i in., 2021) i koktajl bakteriofagów UPWr_S134, w którego skład wchodzi bakteriofagi UPWr_S1, UPWr_S3 i UPWr_S4. Fagi te charakteryzują się względnie szerokim spektrum litycznym, posiadają zdolność do lizy 40 szczepów *Salmonella*, w tym 9 należących do serowaru *S. Gallinarum* oraz 23 należących do serowaru *S. Enteritidis* (Kuźmińska-Bajor i in., 2021). Bakteriofagi te charakteryzują się również litycznym cyklem życiowym. Cecha ta stanowi jedno z najważniejszych kryteriów doboru bakteriofagów stosowanych do stosowania m.in. w przemyśle (Hyman i Abedon, 2010). Ze względu na wysoki potencjał aplikacyjny bakteriofagów UPWr_S1-5 analizowano ich przydatność do eliminowania pałeczek *Salmonella* ze struktur biofilmu.

Dla bakteriofagów UPWr_S1-5 wykazano, że są one zbliżone do siebie pod względem genetycznym i posiadają bardzo tożsame zakresy aktywności. Potwierdzają to wyniki prezentowane w literaturze, gdzie 6 bakteriofagów o bliskim pokrewieństwie posiada niemal pokrywające się zakresy aktywności (Thanki i in., 2022).

Kolejną cechą niezbędną do skutecznego zastosowania aplikacyjnego bakteriofagów jest ich odporność na niekorzystne warunki środowiskowe w miejscu aplikacji. Bakteriofagi cechujące się zdolnością do lizy szczepów pałeczek *Salmonella* charakteryzowane wcześniej, np. bakteriofag P22 (Jeon i Ahn, 2020) zachował całą swoją aktywność w pH powyżej 4, natomiast utrata aktywności zachodziła w pH poniżej tych wartości już po 30 minutach. Bakteriofag vB_SenS_SE1, wykazał aktywność w zakresie pH 4-12 (Lu i in., 2020). Natomiast bakteriofag vB_SalP_TR2 zachował całość swojej aktywności w zakresie pH 5-11 (Shang i in., 2021). Bakteriofag SaFB14 swój zakres aktywności ma przesunięty bardziej w stronę środowiska kwasowego, wykazał działanie w zakresie pH od 3 do 10, przy czym jego optymalny zakres działania jest bardziej ograniczony, gdyż zmieścił się w zakresie 5-8 (Tang i in., 2019). Wyniki przedstawione w literaturze potwierdzają uzyskane wyniki dla bakteriofagów UPWr_S1-5, gdzie w zakresach pH poniżej 4 i powyżej 11 zaobserwowano spadek aktywności litycznej badanych bakteriofagów. Zupełnie innymi właściwościami od większości opisywanych w literaturze bakteriofagów pałeczek *Salmonella* charakteryzuje się bakteriofag ZCSE6, który mimo wykazywania aktywności w zakresie pH od 3 do 12, posiada bardzo wąskie optimum aktywności mieszczące się w środowisku o pH 7 (Abdelsattar i in., 2021). Istnieją jednak przypadki bakteriofagów, jak L66, które zachowują swoją aktywność w znacznie szerszym spektrum pH, będąc skuteczne w środowiskach zarówno bardzo kwaśnych o pH 2 jak i wybitnie zasadowych o pH 12 (Li i in., 2022).

Utrata aktywności bakteriofagów w warunkach panujących w żołądkach kurcząt charakteryzujących się niskim pH oraz obecnością enzymów trawiennych takich jak pepsyna sprawia iż niezbędne jest opracowanie skutecznej strategii ochrony bakteriofagów przed niekorzystnym działaniem tego środowiska w przypadku, gdy bakteriofagi dostarczane są do organizmów kurcząt *per oz.* Jedną z metod ochrony wirusów, zyskującą popularność w ostatnich czasach jest enkapsulacja, polegająca na opłaszczeniu bakteriofaga substancją dającą ochronę przed niekorzystnymi warunkami środowiska (Colom i in., 2017). Jest to metoda niezwykle skuteczna, jednak trudna oraz kosztowna w wykonaniu. Dodatkowo, niezbędne jest opracowanie takich metod, w których bakteriofag zostaje uwolniony z kapsułki dopiero po opuszczeniu kurzego żołądka. Prostszy i mniej kosztowny rozwiązaniem okazuje się wykorzystanie dodatków regulujących pH (Koo i in., 2000; Atterbury i in., 2007). Zmniejszają one kwasowość środowiska w żołądku kurcząt zachowując aktywność aplikowanych wraz z nimi bakteriofagów. Szerokie spektrum aktywności bakteriofagów UPWr_S1-5 w szerokim zakresie pH ułatwia ich stosowanie aplikacyjne, gdyż już niewielki

dodatek środków regulujących pH alkalizuje środowisko żołądka kurcząt zapewniając optymalną aktywność działania koktajlu UPWr_S134 w zwalczaniu pałeczek *Salmonella*. Jednak zawiesiny bakteriofagów, zarówno tworzone w warunkach laboratoryjnych jak i te dostępne na rynku, przy aplikacji zarówno jako dodatek do wody pitnej jak i paszy zachowują swoją aktywność mimo braku środków regulujących pH w swoim składzie (Borie i in., 2008; Wong i in., 2014; de Ornellas Dutka Garcia i in., 2017; Clavijo i in., 2019). Zjawisko to zostało wyjaśnione w niniejszej pracy, gdzie sprawdzono stabilność koktajlu bakteriofagów w warunkach symulowanego soku żołądkowego kurcząt, gdzie dodano wysokobiałkową paszę, co skutkowało podniesieniem pH środowiska pozwalającą na zachowanie aktywności bakteriofagów. Jest to potwierdzeniem wyników przedstawionych w literaturze, gdzie bakteriofagi podawane wraz z pożywieniem skuteczniej niż te administrowane za pośrednictwem aerozolu bądź wody pitnej niszczyły bakterie *Salmonella* obecne w organizmach kurcząt (Mosimann i in., 2021).

W kolejnym etapie badań przeanalizowano zdolność bakteriofagów UPWr_S1-5 w postaci zawiesin zawierających pojedyncze bakteriofagi bądź koktajl UPWr_S134 do zwalczania biofilmu utworzonego na powierzchni polipropylenowych płytek 96-dołkowych, uzyskując znaczną redukcję wielkości biofilmu. Co więcej, elementy systemu dostarczania wody kurczętom takie jak poidła często wykonane są właśnie z tego materiału. W badaniach sprawdzających skuteczność bakteriofagów w zwalczaniu biofilmu z takich powierzchni, najczęściej w postaci płytek wielodołkowych, zaobserwowano podobne rezultaty w porównaniu do badań przedstawionych w niniejszej pracy, uzyskano znaczny stopień redukcji biofilmu *Salmonella* (Islam i in., 2019; Ding i in., 2023). Wykorzystany w badaniach przez Islam i in. (2019) koktajl bakteriofagów przedstawiał niemal wprost proporcjonalną zależność między dawką bakteriofagów a stopniem redukcji biofilmu, gdzie koktajl o mianie 1×10^7 PFU/ml zredukował liczbę bakterii obecnych w biofilmie o $5,50 \log_{10} \text{ jtk/cm}^2$, natomiast w przypadku zastosowania miana 1×10^7 PFU/ml osiągnięto redukcję bakterii o $6,42 \log_{10} \text{ jtk/cm}^2$, efekt ten występuje również w przypadku koktajlu bakteriofagów UPWr_S134, który zastosowany jako zawiesina o mianie 1×10^7 PFU/ml zredukował biofilm pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux i *S. Enteritidis* ATCC 13076 o odpowiednio 75% i 85%, a w przypadku zastosowania miana 1×10^8 PFU/ml redukcja biofilmu osiągała wartości odpowiednio 75% i 85% (Korzeniowski i in., 2022). Zależność ta występowała również w przypadku zawiesin zawierających pojedyncze bakteriofagi UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4 i UPWr_S5. Uzyskane wyniki potwierdzają dane literaturowe (Gong i Jiang, 2017).

W literaturze naukowej brak badań skupiających się na zdolnościach do redukcji biofilmu przez bakteriofagi w postaci zawiesin o bardzo niskich mianach. Badania takie zostały przeprowadzone dla bakteriofagów UPWr_S1-5. Wyniki uzyskane dla tych bakteriofagów wskazują na to, że przy mianie bakteriofagów 1×10^1 PFU/ml uzyskano redukcję biofilmu pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux i *S. Enteritidis* ATCC 13076 w zakresie 40-60%. Daje to możliwość znacznego rozcieńczenia zawiesin fagów UPWr_S1-5 w aplikacyjnym zastosowaniu, a przez to dużej redukcji kosztów ich stosowania, zachowując skuteczność ich działania.

W ramach niniejszej pracy badano zdolność bakteriofagów UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 oraz koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 do niszczenia biofilmu obecnego na powierzchni stali nierdzewnej, co odzwierciedla biofilm obecny na powierzchniach maszyn przemysłu przetwórstwa żywności i hodowli drobiu. Zaobserwowano redukcję biofilmu pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux i *S. Enteritidis* ATCC 13076, a stopień redukcji biofilmu był zależny od miana wykorzystanych bakteriofagów i wynosił od 25% w przypadku zastosowania bakteriofaga UPWr_S2 o mianie 1×10^1 PFU/ml wobec biofilmu *S. Enteritidis* 327 lux do ok. 97% w przypadku zastosowania bakteriofaga UPWr_S3 o mianie 10^9 PFU/ml wobec biofilmu *S. Enteritidis* ATCC 13076. Stopień redukcji biofilmu ukazuje potencjał w stosowaniu badanych bakteriofagów wobec biofilmu utworzonego przez bakterie patogene na powierzchni stali nierdzewnej obecnej np. w procesie przetwórstwa żywności bądź na implantach medycznych. Poprzez rezultaty uzyskane dla bakteriofagów UPWr_S1-5 potwierdzono dane uzyskane przez inne grupy badawcze, redukcja liczby pałeczek *Salmonella* w biofilmie na stali nierdzewnej przy zastosowaniu bakteriofagów LPSTLL, LPST94 i LPST153 oraz ich koktajlu o mianach 1×10^7 PFU/ml i 1×10^8 PFU/ml osiągała wartości odpowiednio $5,5 \log_{10}$ jtk/cm² i $6,4 \log_{10}$ jtk/cm² (Islam i in., 2019). Podobnie, zastosowanie bakteriofagów BP 1369 i BP 1370 o mianie 1×10^8 PFU/ml skutkowało mniejszym niż zaobserwowany w przeprowadzonych eksperymentach spadkiem liczby pałeczek *Salmonella* w biofilmie, wynoszącym $3,0 \log_{10}$ jtk/cm² (Sadekuzzaman i in., 2018), gdy stosowano bakteriofaga LP31 o mianie 1×10^{10} PFU/ml uzyskano obniżenie liczby pałeczek *S. Enteritidis* jedynie o ok. $1,0 \log_{10}$ jtk/cm². Zastosowanie bakteriofaga MSP1 o mianach 1×10^8 PFU/ml i 1×10^9 PFU/ml skutkowało redukcją biofilmu, której wartość również była zależna od zastosowanego miana faga, jednak znacznie mniejszą niż prezentowana w wynikach prezentowanych badań, wynosząc odpowiednio 17.34 % i 26.8 % (Park i in., 2023). Istnieją

również badania, w których nie wykazano żadnej istotnej redukcji biofilmu *Salmonella* na powierzchni stali nierdzewnej przez bakteriofagi (Tajik i in., 2018).

Bakteriofagi UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4, UPWr_S5 oraz koktajl bakteriofagów UPWr_S134 wykorzystano w celu redukcji liczby pałeczek *S. Enteritidis* obecnych na powierzchni liści sałaty, co odzwierciedla warunki, w których do nawożenia upraw sałaty wykorzystuje się zanieczyszczony przez patogeny płynny naturalny nawóz. Wykazano wysoki stopień redukcji liczby pałeczek *Salmonella*, $3-4 \log_{10}$ jtk/cm² zaobserwowano w przypadku zastosowania bakteriofagów UPWr-S1-5 oraz koktajlu UPWr_S134 o mianach od 1×10^7 do 1×10^9 PFU/ml. Podobne rezultaty otrzymano dla bakteriofaga SPJ41 o mianie 1×10^8 PFU/ml zastosowanego wobec biofilmu pałeczek *Salmonella* na powierzchni liści sałaty, gdzie spadek liczby patogenów osiągał wartość rzędu $4,0 \log_{10}$ jtk/cm² (Li i in., 2023) oraz faga LPSTLL, który zmniejszał liczbę pałeczek *Salmonella* na powierzchni liści sałaty o $1 \log_{10}$ jtk/cm² (Guo i in., 2021). Przeciwno biofilmom obecnym na liściach sałaty wykorzystano również fagi BP 1370 i BP 1369 o mianie 10^8 PFU/ml, dla których zaobserwowano stopień redukcji, sięgający $1 \log_{10}$ jtk/cm² (Sadekuzzaman i in., 2018).

W kolejnym etapie badań wykorzystano model eksperymentalny, w którym, w warunkach laboratoryjnych, odzwierciedlono zawartość poideł dla drobiu, w których woda pitna przeznaczona dla kurcząt może zostać zanieczyszczona materią organiczną w różnym stopniu, stanowiącą doskonałe źródło składników odżywczych dla drobnoustrojów. Wykazano skuteczność koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 w zwalczaniu biofilmu pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux w środowiskach o zróżnicowanej ilości składników odżywczych od środowiska obfitującego w składniki odżywcze: podłoża LB, poprzez dziesięciokrotne rozcieńczenie podłoża LB, zawierające umiarkowaną ilość składników odżywczych, aż do wody destylowanej, która stanowiła środowisko ubogie w składniki odżywcze. Pomimo, że koktajl fagowy UPWr_S134 po 9 dniach inkubacji znacznie zmniejszył liczbę pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux przyczepionych do powierzchni poideła dla drobiu w porównaniu z poidłami, gdzie nie dodano bakteriofagów, poziom *S. Enteritidis* 327 lux w poidłach zawierających podłoże LB, jego dziesięciokrotne rozcieńczenie i wodę destylowaną wynosił odpowiednio $3,9 \log_{10}$ jtk/cm², $4,7 \log_{10}$ jtk/cm², $2,7 \log_{10}$ jtk/cm² i nie zmniejszał się podczas inkubacji. Wykazano, że w tych warunkach eksperymentalnych koktajl bakteriofagów UPWr_S134 ogranicza liczebność pałeczek *Salmonella* na powierzchni poideł dla drobiu o $1 \log_{10}$ jtk/cm² niezależnie od zawartości składników odżywczych w środowisku. Dane dotyczące redukcji biofilmu

zależnej od fagów powierzchni z tworzyw sztucznych w przemyśle drobiarskim nie były prezentowane w literaturze naukowej w dużej liczbie, zatem niezbędna jest dalsza ewaluacja tego typu badań

W celu sprawdzenia, czy koktajl bakteriofagów UPWr_S134 może stanowić skuteczny środek do eliminowania pałeczek *Salmonella* z powierzchni poidel dla drobiu w przemysłowej hodowli kurcząt, wykonano badania *in situ*. Przy pomocy innowacyjnego modelu eksperymentalnie zakażonych kurcząt wykazano, że koktajl fagowy posiadał ukierunkowane działanie i skutecznie eliminuje *S. Enteritidis* 327 lux z biofilmu wielogatunkowego obecnego na powierzchni poidła dla drobiu, bez wpływu na pozostałą mikroflorę. Po 9 dniach trwania eksperymentu wykazano całkowitą redukcję liczby pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux w grupie, której podano bakteriofagi, natomiast w grupie bez dodatku bakteriofagów liczba patogenów utrzymywała się na poziomie $2 \log_{10}$ jtk/cm². Dodatkowo, działanie bakteriofagów wobec pałeczek *Salmonella* odbywało się bez oddziaływania na pozostałą mikroflorę obecną w biofilmie, co wykazano poprzez pomiar ogólnej liczby drobnoustrojów, która utrzymywała się na poziomie $7 \log_{10}$ jtk/cm² przez cały czas trwania eksperymentu. W literaturze brak jest badań nad biofilmami w warunkach hodowlanych drobiu i uzyskane wyniki stanowią zupełnie nowy model badawczy jednoznacznie wskazując na skuteczne i selektywne działanie koktajlu UPWr_S134 przeciw pałeczkom *Salmonella* w wielogatunkowym biofilmie.

Tuszki drobiowe mogą być zanieczyszczone pałeczkami *Salmonella* przede wszystkim podczas uboju, gdzie patogeny przenoszą się na tuszę z skażonych narządów wewnętrznych i jelit (Golden i in., 2021). Redukcja liczby patogenów ma wielkie znaczenie dla bezpieczeństwa zdrowia publicznego. Zasugerowano, że redukcja o $2 \log_{10}$ jtk/cm² liczby *Campylobacter* na tuszach drobiowych doprowadziłoby do 30-krotnego spadku liczby przypadków zatrucia skażonym mięsem kurcząt u ludzi (Powell i in., 2012). Z tego powodu zbadano, czy podawanie koktajlu bakteriofagów UPWr_S134 kurczętom wraz z wodą pitną może spowodować zmniejszenie liczby *S. Enteritidis* 327 lux w narządach wewnętrznych kurcząt, takich jak śledziona, wątroba i bursa Fabrycjusza. Oprócz eradykacji *S. Enteritidis* 327 lux z powierzchni poidel dla drobiu, koktajl fagowy UPWr_S134 znacznie zmniejszył liczbę tego patogenu w bursach Fabrycjusza u kurcząt, którym podawano wraz z wodą pitną koktajl fagowy. Natomiast zmniejszenie liczby pałeczek *S. Enteritidis* 327 lux w śledzionie i wątrobie była statystycznie nieistotna w porównaniu z ptakami, którym nie podawano koktajlu UPWr_S134. Potwierdza to dane literaturowe uzyskane wcześniej przez Vaz i in. (2020), w których wykazano, że częstość występowania *S. Enteritidis* w próbkach wątroby, śledziony

grudkach chłonnych jelit ślepych nie różnią się istotnie ($p > 0,05$) między ptakami, którym podano bakteriofagi BRM 13312, BRM 13313 i BRM 13314 i grupą, której ich nie podano. Niska zdolność fagów do redukcji patogenów w narządów wewnętrznych może być wynikiem metody, za pomocą której podawano kurczętom bakteriofagi. Dane literaturowe wskazują, że droga podawania może znacząco wpływać na skuteczność działania bakteriofagów (Mosimann i in., 2021). Borie i in. (2008) przedstawili, że koktajl bakteriofagowy zawierający fagi BP1, BP2 i BP3 znacznie zmniejszył liczbę pałeczek *S. Enteritidis* u ptaków, którym podano bakteriofagi w postaci oprysku gruboziarnistego lub jako dodatek do wody pitnej. Ta druga metoda była mniej skuteczna w eliminacja patogenu z narządów wewnętrznych. Zdolności koktajlu fagowego UPWr_S134 do zwalczania pałeczek *S. Enteritidis* będą dalej badane w celu bardziej dokładnej analizy potencjału aplikacyjnego tego koktajlu.

5.2 Rola bakteriofagów w zwalczaniu biofilmu patogennych dla drobiu *E. coli*

Bakteriofagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3 oraz UPWr_E4 charakteryzują się nie tylko litycznym cyklem replikacyjnym, ale również szerokim spektrum działania, posiadając zdolności lityczne względem nie tylko 48 szczepów *E. coli*, ale także 10 szczepów *Klebsiella pneumoniae* oraz 6 szczepów pałeczek *Salmonella*. Spełniają tym samym najważniejsze kryteria doboru bakteriofagów do zastosowań aplikacyjnych (Hyman i Abedon, 2010; Endersen i in., 2014).

Kolejną cechą bakteriofagów niezbędną do ich skutecznego zastosowania aplikacyjnego jest ich zdolność do przetrwania w środowiskach o niekorzystnych warunkach, takim jak sok żołądkowy. Jednak w warunkach symulowanego soku żołądkowego o pH 2 i zawierającego pepsynę bakteriofagi UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3 oraz UPWr_E4 tracą swoją aktywność lityczną już po 30 minutach. Dodatek 0,1 M węglanu wapnia neutralizuje kwasowość środowiska na tyle, by zachować niemal całą aktywność lityczną bakteriofagów na poziomie $9 \log_{10}$ PFU/ml dla UPWr_E1, UPWr_E2 i UPWr_E4 oraz $8 \log_{10}$ PFU/ml dla UPWr_E3. Potwierdza to wyniki przedstawione przez inne zespoły badawcze. Ramirez i in. (2018), którzy w swojej pracy wykazali wzrost stopnia zachowania aktywności koktajlu bakteriofagów Φ JLA23, Φ KP26, Φ C119 i Φ E142 z 15% do 90% gdy pH buforu SGF wzrosło z 2 do 3. Podobne wyniki przedstawiono dla bakteriofaga PNJ1901, który po 30 minutach inkubacji w SGF obniżył swoją aktywność lityczną do zera (Yin i in., 2021). Dla faga K1F infekującego *E. coli* wykazano utratę aktywności w pH 2 po 30 minutach inkubacji. Natomiast, gdy pH środowiska wzrosło do wartości 3, zachowywał 90% swojej aktywności litycznej nawet

po 24 h inkubacji w tym środowisku (Vinner i in., 2019). W badaniach przedstawionych przez Kaczorowska i in. (2021) wykorzystano bakteriofagi JK1, JK08, JK16, JK36 i JK38 specyficzne względem *E. coli* charakteryzujące się szerokim spektrum litycznym działania podobnie jak bakteriofagi UPWr_E1-4, które również traciły swoją aktywność w warunkach symulowanego soku żołądkowego. W literaturze najczęstszym sposobem poprawy zachowania aktywności litycznej przez bakteriofagi w środowisku o pH 2 była mikroenkapsulacja. Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy oraz doniesienia literaturowe na temat znacznej różnicy aktywności fagów przy niewielkim wzroście pH środowiska wskazują, że znacznie prostszym i, przy stosowaniu aplikacyjnym bakteriofagów w przemyśle hodowlanym, tańszym rozwiązaniem jest niewielki dodatek neutralizatorów pH.

Zdolność patogennych dla drobiu *E. coli* do tworzenia biofilmu została do tej pory wielokrotnie przedstawiona w literaturze naukowej (Skyberg i in., 2007; Korf i in., 2020; Nie i in., 2020; Ruan i in., 2021). Badany w niniejszej pracy szczep *E. coli* 158B lux scharakteryzowany jako średni producent biofilmu, natomiast szczep *E. coli* NCTC 17848 określono jako silnego producenta biofilmu (rozdz. 4.2.2). Wśród patogennych dla drobiu *E. coli* scharakteryzowano zarówno silnych producentów biofilmu, jak i szczepy niezdolne do tworzenia biofilmu (Oosterik i in., 2014).

Jedną z powierzchni wykorzystywanych do wzrostu biofilmu APEC powierzchni jest polipropylen- materiał, z którego wykonane są m.in. elementy systemów dostarczającym wodę kurczętom w hodowlach przemysłowych (Amaral, 2004). Uzyskano znaczną redukcję wielkości biofilmu przy zastosowaniu mian 1×10^8 - 1×10^9 PFU/ml bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajlu bakteriofagów UPWr_E124 redukcja wynosiła dla biofilmu *E. coli* 158B lux 65-85%, a dla biofilmu *E. coli* NCTC 17848 65-80%. Skuteczność bakteriofagów w zwalczaniu biofilmu *E. coli*. w tym APEC, potwierdzają dane literaturowe. Bakteriofag WGqlae o mianie 2×10^8 PFU/ml dodany na początku procesu tworzenia się biofilmu redukował jego wielkość o 40 % (Li i in., 2020). Przy pomocy bakteriofaga O78 o mianie 1×10^7 PFU/ml zwalczono szczep APEC, zredukowano biofilm o połowę (Eid i in., 2022). Zależność stopnia redukcji biofilmu od zastosowanego miana zawiesiny bakteriofaga przedstawiona w niniejszej pracy, gdzie wykazano średnią redukcję biofilmu *E. coli* 158B lux o 80% przy stosowaniu bakteriofagów o mianie 1×10^9 PFU/ml, a już dla bakteriofagów o mianach 1×10^8 PFU/ml redukcja wynosiła średnio ok 75%, dla szczepu *E. coli* NCTC 17848 wartości te wynosiły odpowiednio 75% i 65%. Zależność redukcji biofilmu od miana bakteriofagów została również przedstawiona w literaturze. W badaniach przedstawionych

przez Ribeiro i in. (2018) wykazano redukcję biofilmu o 80% przystosowaniu faga EcoM017 o mianie 1×10^8 PFU/ml, a przy stosowaniu miana 1×10^5 PFU/ml wartość ta spadła do 75%. Do tej pory opublikowano niewiele danych literaturowych na temat zastosowania bardzo niskich 1×10^3 - 1×10^1 PFU/ml mian zawiesin bakteriofagów. Ribeiro i in. (2018) wykazali zdolność bakteriofaga EcoM017 do redukcji biofilmu *E. coli* przy stosowaniu miana 1×10^1 PFU/ml. Dla bakteriofagów UPWr_E1-4 tak niskiego miana skutkowało 21-33% skutecznością w redukcji biofilmu.

W badaniach nad wpływem bakteriofagów na liczbę bakterii w biofilmie tworzonym na powierzchni stalowej najczęściej używa podkładek pod śruby. Dla bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajlu bakteriofagów UPWr_E124 wykazano skuteczność w zwalczaniu biofilmu *E. coli* utworzonego na powierzchni stali nierdzewnej, osiągającą dla mian zastosowanych fagów 10^7 - 10^9 PFU/ml wartości 65-75% niezależnie od zastosowanego szczepu *E. coli*. Uzyskane wyniki obrazują zależność między zastosowanym mianem fagów a wielkością redukcji biofilmu. Podobne wyniki uzyskali González-Gómez i in., (2021), w badaniach których bakteriofagi B_EcoP_PL-01, vB_EcoP_GB-02, vB_EcoP_GB-03 oraz ich mieszanina o mianach 1×10^8 PFU/ml i 1×10^9 PFU/ml zredukowały liczbę bakterii *E. coli* obecnych na powierzchni stalowej odpowiednio o 2,4-6,9 \log_{10} jtk/cm² i 0,9-2,8 \log_{10} jtk/cm² dla bakteriofagów B_EcoP_PL-01, vB_EcoP_GB-02, vB_EcoP_GB-03. Natomiast inkubacja biofilmu *E. coli* na powierzchni stali bakteriofagiem AZO145A o mianie 1×10^{10} PFU/ml zredukowano liczbę bakterii o 3 \log_{10} jtk/cm² (Wang i in., 2020). Również dla bakteriofaga KH1 o mianie $1 \times 10^{7.5}$ PFU/ml osiągnięto redukcję liczby komórek *E. coli* o 1 \log_{10} jtk/cm² (Sharma i in., 2005). Podobnie jak w przypadku biofilmu *E. coli* utworzonego na powierzchni polistyrenu, również wobec biofilmu na powierzchni stali nie stosowano bakteriofagów o mianach poniżej 1×10^2 PFU/ml, zamieszczone w niniejszej pracy wyniki wskazują na redukcję wielkości biofilmu o poprzez działanie bakteriofagów nawet przy stosowaniu tak małych liczb cząstek faga, co potencjalnie mogłoby mieć wpływ na obniżenie kosztów wytworzenia preparatu komercyjnego.

Patogenne dla drobiu *E. coli* stanowią zagrożenie nie tylko dla drobiu, ale również dla człowieka, ze względu na zwiększoną zdolność do horyzontalnego transferu genów wirulencji oraz lekooporności do bakterii komensalnych. Nawożenie upraw roślin użytkowych, w tym sałaty, naturalnym nawozem pochodzącym z hodowli drobiu może skutkować obecnością szczepów APEC na żywności, a zdolność do tworzenia biofilmu również na powierzchniach biotycznych utrudnia ich usunięcie (Markland i in., 2015). Dla bakteriofagów UPWr_E1,

UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajlu bakteriofagów UPWr_E124 wykazano liczby *E. coli* 158B lux na powierzchni liści sałaty o odpowiednio 1,2-2,2 log₁₀ jtk/cm², 1,9-2,5 log₁₀ jtk/cm², 1,2-1,4 log₁₀ jtk/cm², 1,5-2,2 log₁₀ jtk/cm² i 1,6-2,4 log₁₀ jtk/cm² przy zastosowaniu mian bakteriofagów o mianach 1 x 10⁷-1 x 10⁹ PFU/ml. Dla szczepu *E. coli* NCTC 17848 wartości te wynosiły odpowiednio 1,6-1,8 log₁₀ jtk/cm², 1,4-1,7 log₁₀ jtk/cm², 1,1-1,3 log₁₀ jtk/cm², 1,3-2,1 log₁₀ jtk/cm² i 1,3-2,2 log₁₀ jtk/cm². Skuteczność bakteriofagów przeciwko biofilmowi *E. coli* na powierzchni sałaty została potwierdzona poprzez dane przedstawione przez innych autorów. Litt i in. (2020) przedstawili całkowitą eliminację patogennych dla drobiu *E. coli*, natomiast wyniki przedstawione przez Sharma i in. (2009) wskazują na redukcję rzędu 2 log₁₀ jtk/cm². W kolejnych badaniach udokumentowano spadek poziomu żywych *E. coli* O157:H7 na poziomie 0,4 log jtk na liściach sałaty rzymskiej (Viazis i in., 2011). W tym badaniu wykazano, że specyficzna dla odmiany sałaty morfologia powierzchni liści może wpływać na utrzymywanie się i przeżywalność enteropatogenów na powierzchni świeżych produktów, co wskazuje na konieczność dalszych szczegółowych badań skuteczności bakteriofagów wobec biofilmu obecnego na powierzchni rozmaitych roślin, mających potencjalny kontakt z naturalnym nawozem.

E. coli pochodzące od drobiu mogą dostać się do organizmu ludzkiego nie tylko za pośrednictwem zanieczyszczonych roślin, ale również poprzez skażone mięso drobiowe. Na powierzchni mięsa mogą one tworzyć biofilm, przez co usunięcie tych drobnoustrojów staje się znacznie trudniejsze (Anang i in., 2010; Possas i in., 2021). Wykazano obniżenie poziomu żywych komórek *E. coli* na powierzchni mięsa piersi drobiowej przy zastosowaniu bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajlu bakteriofagów UPWr_E124 o mianie 1 x 10⁹ PFU/ml o 90%. Bakteriofagi zapobiegały również dalszemu rozwojowi bakterii zarówno w warunkach chłodniczych jak i w podwyższonej temperaturze. Wyniki te potwierdzają dane literaturowe, w których szczep *E. coli* O157:H7 obecny na powierzchni fileta kurcząt został zredukowany o 97% przy pomocy komercyjnego koktajlu bakteriofagów EcoShield PX (Vikram i in., 2020). Z kolei bakteriofagi PBL66-CL1 PBL116-CS6 obniżyły liczbę bakterii *E. coli* EBL116 na powierzchni mięsa drobiowego o 1.67 log₁₀ jtk/4 cm² w warunkach chłodniczych (Hoang Minh i in., 2016) co potwierdza dane uzyskane dla bakteriofagów UPWr_E1-4. Natomiast w badaniach przedstawionych przez Jassim i in. (2012), gdzie wykorzystano bakteriofaga CEH-162 przeciwko *E. coli* EH-162 na powierzchni mielonego mięsa wykazano brak inhibicji wzrostu bakterii przy dłuższym niż 7h okresie przechowywania w warunkach chłodniczych.

Wyniki przeprowadzonych badań nad zdolnością bakteriofagów do redukcji liczby bakterii w biofilmie ujawniły znaczny potencjał aplikacyjny w zwalczaniu biofilmu na powierzchniach biotycznych i abiotycznych zarówno bakteriofagów UPWr_S1, UPWr_S2, UPWr_S3, UPWr_S4 i UPWr_S5, ale również bakteriofagów UPWr_E1, UPWr_E2, UPWr_E3, UPWr_E4 oraz koktajli UPWr_S134 i UPWr_E124. Prezentowane wyniki stanowią punkt wyjścia dla przyszłych badań nad skutecznością bakteriofagów w zwalczaniu biofilmu *Salmonella* i APEC *in situ*.

6. Wnioski

1. Niskie pH oraz obecność pepsyny w soku żołądkowym kurcząt stwarzają niekorzystne warunki zarówno dla drobnoustrojów jak i wirusów. Utrudnia to skuteczne stosowanie bakteriofagów w przypadku podania *per os*. Rezultaty przeprowadzonych badań wskazują, że dodatek węgla wapnia lub paszy wysokobiałkowej pozwala na zachowanie aktywności bakteriofagów UPWr_S1-5 w środowisku soku żołądkowego kurcząt. W przypadku bakteriofagów UPWr_E1-4 wykazano zachowanie aktywności litycznej przy zastosowaniu dodatku węgla wapnia.
2. Pałeczki *Salmonella* obecne na powierzchniach maszyn przemysłu produkcji tuszek drobiowych, jaj oraz na powierzchni warzyw stanowią znaczne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności. W badaniach wykazano, że bakteriofagi UPWr_S1-5 oraz koktajl bakteriofagów UPWr_S134 charakteryzują się wysokimi zdolnościami redukcji biofilmu APEC na powierzchniach biotycznych oraz abiotycznych. Najwyższą redukcję zaobserwowano na powierzchni plastiku oraz stali nierdzewnej, o wartościach odpowiednio 96% i 97%. Redukcja liczby pałeczek *Salmonella* na powierzchni liści sałaty osiągnęła wartość 55%.
1. W warunkach hodowli drobiu stopień zanieczyszczenia mikrobiologicznego poideł jest zmienny. Zaobserwowano, że koktajl bakteriofagów UPWr_S134 ogranicza wzrost pałeczek *Salmonella* Enteritidis na powierzchni poideł dla drobiu niezależnie od ilości składników odżywczych w środowisku, co odpowiada różnej zawartości materii organicznej gromadzącej się w poidłach.
- 2.
3. Główną drogą transmisji bakterii, w tym bakterii patogennych u drobiu jest droga oralno-fekalna, przez co na powierzchni poideł znajduje się wiele różnych drobnoustrojów. W pracy wykazano, że koktajl bakteriofagów UPWr_S134 całkowicie eliminuje pałeczki *Salmonella* Enteritidis z tego wielogatunkowego biofilmu w warunkach hodowli brojlerów.
4. Rozprzestrzenianie się lekoopornych szczepów APEC w stadach drobiu jest związane ze zdolnością do tworzenia biofilmu na różnych powierzchniach. Najbardziej stabilne biofilmy powstają na powierzchni plastiku, stali nierdzewnej oraz, przez transmisję

ptasich odchodów na pola uprawne, powierzchni warzyw. Wykazano, że bakteriofagi UPWr_E1-4 oraz koktajl bakteriofagów UPWr_E124 w znacznym stopniu redukują biofilm na powierzchniach biotycznych oraz abiotycznych. Najwyższą redukcję zaobserwowano na powierzchni plastiku oraz stali nierdzewnej, osiągając wartości odpowiednio 84% i 88%. Liczbę patogennych dla drobiu *Escherichia coli* na powierzchni liści sałaty zredukowano o 35%.

5. Podczas uboju brojlerów dochodzi do kontaminacji tuszek drobiowych, co skutkuje przeniesieniem lekoopornych szczepów bakteryjnych takich jak APEC na ludzi, co może wiązać się z horyzontalnym transferem genów lekooporności. Bakteriofagi UPWr_E1-4 ograniczają wzrost patogennych dla drobiu *Escherichia coli* na powierzchni mięsa w warunkach chłodniczych.

7. Bibliografia

- Abdelsattar, A. S., Safwat, A., Nofal, R., Elsayed, A., Makky, S., i El-Shibiny, A. (2021). Isolation and Characterization of Bacteriophage ZCSE6 against *Salmonella* spp.: Phage Application in Milk. *Biologics* 1, 164–176. doi:10.3390/biologics1020010.
- Abdullah, I. N. (2010). Isolation and identification of some bacterial isolates from table egg. *Al-Anbar J. Vet. Sci.* 3. Available at: <https://www.iasj.net/iasj/article/34501> [Udostępniono maj 22, 2023].
- Abedon, S. T. (1990). Selection for lysis inhibition in bacteriophage. *J. Theor. Biol.* 146, 501–511. doi:10.1016/S0022-5193(05)80375-3.
- Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., i Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 1, 66–85. doi:10.4161/bact.1.2.15845.
- Ackermann, H. W. (1987). Bacteriophage taxonomy in 1987. *Microbiol. Sci.* 4, 214–218. Available at: <https://europepmc.org/article/med/3153614> [Udostępniono maj 22, 2023].
- Ackermann, H. W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol.* 152, 227–243. doi:10.1007/S00705-006-0849-1/METRICS.
- Ackermann, H. W., i Prangishvili, D. (2012). Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch. Virol.* 157, 1843–1849. doi:10.1007/S00705-012-1383-Y/TABLES/2.
- Adams, M. (1959). *Bacteriophages*. New York, NY: Interscience Publishers.
- Adhikari, P. A., Cosby, D. E., Cox, N. A., Lee, J. H., i Kim, W. K. (2017). Effect of dietary bacteriophage supplementation on internal organs, fecal excretion, and ileal immune response in laying hens challenged by *Salmonella* Enteritidis. *Poult. Sci.* 96, 3264–3271. doi:10.3382/ps/pex109.
- Afshari, A., Baratpour, A., Khanzade, S., i Jamshidi, A. (2018). *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimorium identification in poultry carcasses. *Iran. J. Microbiol.* 10, 45. Available at: </pmc/articles/PMC6004630/> [Udostępniono maj 22, 2023].
- Ahmed, M. N., Porse, A., Sommer, M. O. A., Høiby, N., i Ciofu, O. (2018). Evolution of Antibiotic Resistance in Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa* Populations Exposed to Subinhibitory Levels of Ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62. doi:10.1128/AAC.00320-18.

- Amaral, L. do (2004). Drinking water as a risk factor to poultry health. *Rev. Bras. Ciência Avícola* 6, 191–199. doi:10.1590/S1516-635X2004000400001.
- Anang, D. M., Rusul, G., Ling, F. H., i Bhat, R. (2010). Inhibitory effects of lactic acid and lauricidin on spoilage organisms of chicken breast during storage at chilled temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 152–159. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.014.
- Anderson, G. G., i O'Toole, G. A. (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 85–105. doi:10.1007/978-3-540-75418-3_5/COVER.
- Andreatti Filho, R. L., Higgins, J. P., Higgins, S. E., Gaona, G., Wolfenden, A. D., Tellez, G., i in. (2007). Ability of Bacteriophages Isolated from Different Sources to Reduce *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis *In Vitro* and *In Vivo*. *Poult. Sci.* 86, 1904–1909. doi:10.1093/ps/86.9.1904.
- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., i Peixe, L. (2016). Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 110–121. doi:10.1016/J.CMI.2015.12.004.
- Atterbury, R. J., Connerton, P. L., Dodd, C. E. R., Rees, C. E. D., i Connerton, I. F. (2003). Application of Host-Specific Bacteriophages to the Surface of Chicken Skin Leads to a Reduction in Recovery of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6302–6306. doi:10.1128/AEM.69.10.6302-6306.2003.
- Atterbury, R. J., Van Bergen, M. A. P., Ortiz, F., Lovell, M. A., Harris, J. A., De Boer, A., i in. (2007). Bacteriophage Therapy To Reduce *Salmonella* Colonization of Broiler Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4543–4549. doi:10.1128/AEM.00049-07.
- Austin, J. W., Sanders, G., Kay, W. W., i Collinson, S. K. (1998). Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 162, 295–301. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13012.x.
- Bailey, J. S. (1988). Integrated Colonization Control of *Salmonella* in Poultry. *Poult. Sci.* 67, 928–932. doi:10.3382/ps.0670928.
- Bakteriofagi - dobrotoczne wirusy - IKiFP PAN Available at:
<https://ikifp.edu.pl/spoleczenstwo/artykuly-popularnonaukowe/bakteriofagi-dobrotoczne-wirusy/> [Udostępniono czerwiec 12, 2023].
- Bardina, C., Spricigo, D. A., Cortés, P., i Llagostera, M. (2012). Significance of the

- Bacteriophage Treatment Schedule in Reducing Salmonella Colonization of Poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6600–6607. doi:10.1128/AEM.01257-12.
- Barnhart, M. M., i Chapman, M. R. (2006). Curli Biogenesis and Function. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142106> 60, 131–147. doi:10.1146/ANNUREV.MICRO.60.080805.142106.
- Barraud, N., Hasset, D. J., Hwang, S.-H., Rice, S. A., Kjelleberg, S., i Webb, J. S. (2006). Involvement of Nitric Oxide in Biofilm Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 7344–7353. doi:10.1128/JB.00779-06.
- Baty, A. M., Frølund, B., Geesey, G. G., Langille, S., Quintero, E. J., Suci, P. A., i in. (1996). Adhesion of biofilms to inert surfaces: A molecular level approach directed at the marine environment. *Biofouling* 10, 111–121. doi:10.1080/08927019609386274.
- Bauchart, P., Germon, P., Brée, A., Oswald, E., Hacker, J., i Dobrindt, U. (2010). Pathogenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli* – Search for factors involved in host specificity or zoonotic potential. *Microb. Pathog.* 49, 105–115. doi:10.1016/j.micpath.2010.05.004.
- Bélangier, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., i Dozois, C. M. (2011). *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62, 1–10. doi:10.1111/J.1574-695X.2011.00797.X.
- Bichler, L. A., Nagaraja, K. V., i Pomeroy, B. S. (1994). Plasmid Diversity in *Salmonella enteritidis* of Animal, Poultry, and Human Origin. *J. Food Prot.* 57, 4–11. doi:10.4315/0362-028X-57.1.4.
- Boas, D. V., Almeida, C., Azevedo, N., Sillankorva, S., i Azeredo, J. (2019). „Techniques to Assess Phage–Biofilm Interaction”, w, 137–146. doi:10.1007/978-1-4939-8940-9_11.
- Borges, K. A., Furian, T. Q., Souza, S. N., Menezes, R., Tondo, E. C., Salle, C. T. P., i in. (2018). Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. *Pesqui. Veterinária Bras.* 38, 71–76. doi:10.1590/1678-5150-pvb-4928.
- Borie, C., Albala, I., Sánchez, P., Sánchez, M. L., Ramírez, S., Navarro, C., i in. (2008). Bacteriophage Treatment Reduces *Salmonella* Colonization of Infected Chickens. *Avian Dis.* 52, 64–67. doi:10.1637/8091-082007-Reg.

- Borie, C., Sánchez, M. L., Navarro, C., Ramírez, S., Morales, M. A., Retamales, J., i in. (2009). Aerosol Spray Treatment with Bacteriophages and Competitive Exclusion Reduces Salmonella Enteritidis Infection in Chickens. *Avian Dis.* 53, 250–254. doi:10.1637/8406-071008-Reg.1.
- Bower, C. K., i Daeschel, M. A. (1999). Resistance responses of microorganisms in food environments. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 33–44. doi:10.1016/S0168-1605(99)00075-6.
- Briandet, R., Lacroix-Gueu, P., Renault, M., Lecart, S., Meylheuc, T., Bidnenko, E., i in. (2008). Fluorescence Correlation Spectroscopy To Study Diffusion and Reaction of Bacteriophages inside Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2135–2143. doi:10.1128/AEM.02304-07.
- Byrd, J. A., Corrier, D. E., DeLoach, J. R., i Nisbet, D. J. (1997). Comparison of drag-swab environmental protocols for the isolation of Salmonella in poultry houses. *Avian Dis.* 41, 709–713. doi:10.2307/1592165.
- Chapman, H. D., i Johnson, Z. B. (2002). Use of Antibiotics and Roxarsone in Broiler Chickens in the USA: Analysis for The Years 1995 to 2000. *Poult. Sci.* 81, 356–364. doi:10.1093/PS/81.3.356.
- Chen, H. M., Wang, Y., Su, L. H., i Chiu, C. H. (2013). Nontyphoid Salmonella Infection: Microbiology, Clinical Features, and Antimicrobial Therapy. *Pediatr. Neonatol.* 54, 147–152. doi:10.1016/J.PEDNEO.2013.01.010.
- Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.-L., i Brüßow, H. (2004). Phage-Host Interaction: an Ecological Perspective. *J. Bacteriol.* 186, 3677–3686. doi:10.1128/JB.186.12.3677-3686.2004.
- Chylkova, T., Cadena, M., Ferreiro, A., i Pitesky, M. (2017). Susceptibility of Salmonella Biofilm and Planktonic Bacteria to Common Disinfectant Agents Used in Poultry Processing. *J. Food Prot.* 80, 1072–1079. doi:10.4315/0362-028X.JFP-16-393.
- Clavijo, V., Baquero, D., Hernandez, S., Farfan, J. C., Arias, J., Arévalo, A., i in. (2019). Phage cocktail SalmoFREE® reduces Salmonella on a commercial broiler farm. *Poult. Sci.* 98, 5054–5063. doi:10.3382/ps/pez251.
- Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., i in. (2011). Animal and human pathogenic Escherichia coli strains share common genetic

- backgrounds. *Infect. Genet. Evol.* 11, 654–662. doi:10.1016/J.MEEGID.2011.02.005.
- Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., i Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage* 1, 31–45. doi:10.4161/bact.1.1.14942.
- Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Aríñez-Soriano, J., Cortés, P., Maspoch, D., i in. (2017). Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Sci. Rep.* 7, 41441. doi:10.1038/srep41441.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., i Muniesa, M. (2011). Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples. *PLoS One* 6, e17549. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0017549.
- Colwell, R. R., i Hill, R. T. (1995). Potential developments in marine biotechnology. *Oceanogr. Lit. Rev.* 12, 1151. Available at: <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-73cafb60-7c6a-34c6-99cb-a47ac4c36ed6> [Udostępniono maj 23, 2023].
- Comeau, A. M., i Krisch, H. M. (2005). War is peace — dispatches from the bacterial and phage killing fields. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 488–494. doi:10.1016/j.mib.2005.06.004.
- Corcoran, M., Morris, D., De Lappe, N., O'Connor, J., Lalor, P., Dockery, P., i in. (2014). Commonly Used Disinfectants Fail To Eradicate *Salmonella enterica* Biofilms from Food Contact Surface Materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1507–1514. doi:10.1128/AEM.03109-13.
- Cornelissen, A., Ceyskens, P.-J., T'Syen, J., Van Praet, H., Noben, J.-P., Shaburova, O. V., i in. (2011). The T7-Related *Pseudomonas putida* Phage ϕ 15 Displays Virion-Associated Biofilm Degradation Properties. *PLoS One* 6, e18597. doi:10.1371/journal.pone.0018597.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., i Lappin-Scott, H. M. (1995). MICROBIAL BIOFILMS. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., i Greenberg, E. P. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science (80-.)*. 284, 1318–1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318.
- Cox, J. M. (1995). *Salmonella enteritidis*: Virulence factors and invasive infection in poultry.

- Trends Food Sci. Technol.* 6, 407–410. doi:10.1016/S0924-2244(00)89219-5.
- Crum, N. F. (2003). Current trends in typhoid fever. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 5, 279–286. doi:10.1007/S11894-003-0064-0/METRICS.
- Crump, J. A., Griffin, P. M., i Angulo, F. J. (2002). Bacterial Contamination of Animal Feed and Its Relationship to Human Foodborne Illness. *Clin. Infect. Dis.* 35, 859–865. doi:10.1086/342885.
- Current ICTV Taxonomy Release | ICTV Available at: <https://ictv.global/taxonomy> [Udostępniono maj 22, 2023].
- Curtin, J. J., i Donlan, R. M. (2006). Using Bacteriophages To Reduce Formation of Catheter-Associated Biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1268–1275. doi:10.1128/AAC.50.4.1268-1275.2006.
- Dale, A. P., i Woodford, N. (2015). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *J. Infect.* 71, 615–626. doi:10.1016/J.JINF.2015.09.009.
- Das, T., Sehar, S., i Manefield, M. (2013). The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 778–786. doi:10.1111/1758-2229.12085.
- Davies, R. H., i Wray, C. (1995). Mice as carriers of *Salmonella enteritidis* on persistently infected poultry units. *Vet. Rec.* 137, 337–341. doi:10.1136/VR.137.14.337.
- de Ornellas Dutka Garcia, K. C., de Oliveira Corrêa, I. M., Pereira, L. Q., Silva, T. M., de Souza Ribeiro Mioni, M., de Moraes Izidoro, A. C., i in. (2017). Bacteriophage use to control *Salmonella* biofilm on surfaces present in chicken slaughterhouses. *Poult. Sci.* 96, 3392–3398. doi:10.3382/ps/pex124.
- de Vylder, J. D., Dewulf, J., van Hoorebeke, S. V., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., i in. (2011). Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in groups of experimentally infected laying hens housed in different housing systems. *Poult. Sci.* 90, 1391–1396. doi:10.3382/PS.2010-00944.
- Deborah Chen, H., i Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 83–98. doi:10.1016/J.FEMSRE.2004.07.002.
- Diarra, M. S., i Malouin, F. (2014). Antibiotics in Canadian poultry productions and

- anticipated alternatives. *Front. Microbiol.* 5, 282.
doi:10.3389/FMICB.2014.00282/BIBTEX.
- Díaz-Muñoz, S. L., i Koskella, B. (2014). „Bacteria–Phage Interactions in Natural Environments”, w, 135–183. doi:10.1016/B978-0-12-800259-9.00004-4.
- Ding, Y., Huang, C., Zhu, W., Li, Z., Zhang, Y., Wang, J., i in. (2023). Characterization of a novel Jerseyvirus phage T102 and its inhibition effect on biofilms of multidrug-resistant Salmonella. *Virus Res.* 326, 199054. doi:10.1016/j.virusres.2023.199054.
- Dion, M. B., Oechslin, F., i Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020 183 18, 125–138. doi:10.1038/s41579-019-0311-5.
- Donlan, R. M. (2001). Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clin. Infect. Dis.* 33, 1387–1392. doi:10.1086/322972.
- Eid, S., Tolba, H. M. N., Hamed, R. I., i Al-Atfeehy, N. M. (2022). Bacteriophage therapy as an alternative biocontrol against emerging multidrug resistant E. coli in broilers. *Saudi J. Biol. Sci.* 29, 3380–3389. doi:10.1016/j.sjbs.2022.02.015.
- El-Shibiny, A., Connerton, P. L., i Connerton, I. F. (2007). Campylobacter succession in broiler chickens. *Vet. Microbiol.* 125, 323–332. doi:10.1016/J.VETMIC.2007.05.023.
- Endersen, L., O’Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., i Coffey, A. (2014). Phage Therapy in the Food Industry. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092415> 5, 327–349. doi:10.1146/ANNUREV-FOOD-030713-092415.
- Erjavec, M. S., i Žgur-Bertok, D. (2015). Virulence potential for extraintestinal infections among commensal Escherichia coli isolated from healthy humans—the Trojan horse within our gut. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 61. doi:10.1093/FEMSLE/FNU061.
- Ewers, C., Janßen, T., i Wieler, L. H. (2003). [Avian pathogenic Escherichia coli (APEC)]. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 116, 381–395. Available at: <https://europepmc.org/article/med/14526468> [Udostępniono maj 22, 2023].
- Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kießling, S., Alt, K., Antão, E. M., i in. (2007). Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: How closely related are they? *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 163–176. doi:10.1016/J.IJMM.2007.01.003.

- Fanning, S., i Mitchell, A. P. (2012). Fungal Biofilms. *PLoS Pathog.* 8, e1002585.
doi:10.1371/journal.ppat.1002585.
- Fernando, N., Werner, S., Elhaddad, M., Davies, J., i Firoozabadi, R. (2020). Do Antibiotic Beads Need to be Removed? *Arch. Bone Jt. Surg.* 8, 502.
doi:10.22038/ABJS.2020.44143.2208.
- Ferriol-González, C., i Domingo-Calap, P. (2020). Phages for Biofilm Removal. *Antibiotics* 9, 268. doi:10.3390/antibiotics9050268.
- Ferry, T., Kolenda, C., Batailler, C., Gustave, C. A., Lustig, S., Malatray, M., i in. (2020). Phage Therapy as Adjuvant to Conservative Surgery and Antibiotics to Salvage Patients With Relapsing *S. aureus* Prosthetic Knee Infection. *Front. Med.* 7, 721.
doi:10.3389/FMED.2020.570572/BIBTEX.
- Fiorentin, L., Vieira, N. D., i Barioni Jr, W. (2005). Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol.* 34, 258–263. doi:10.1080/01445340500112157.
- Flemming, H. C., i Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010 89 8, 623–633. doi:10.1038/nrmicro2415.
- Formal, S. B., Gemski, P., Giannella, R. A., i Rout, W. R. (1975). Studies on Shigellosis and Salmonellosis. *Gram-Negative Bact. Infect. Mode Endotoxin Actions*, 16–23.
doi:10.1007/978-3-7091-8396-0_3.
- Friedman, S. D., Cooper, E. M., Casanova, L., Sobsey, M. D., i Genthner, F. J. (2009). A reverse transcription-PCR assay to distinguish the four genogroups of male-specific (F+) RNA coliphages. *J. Virol. Methods* 159, 47–52. doi:10.1016/J.JVIROMET.2009.02.028.
- Furtula, V., Jackson, C. R., Farrell, E. G., Barrett, J. B., Hiott, L. M., i Chambers, P. A. (2013). Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. Isolated from Environmental Samples in an Area of Intensive Poultry Production. *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* 2013, Vol. 10, Pages 1020-1036 10, 1020–1036. doi:10.3390/IJERPH10031020.
- García, P., Madera, C., Martínez, B., i Rodríguez, A. (2007). Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *Int. Dairy J.* 17, 1232–1239. doi:10.1016/j.idairyj.2007.03.014.
- Golden, C. E., Rothrock, M. J., i Mishra, A. (2021). Mapping foodborne pathogen

- contamination throughout the conventional and alternative poultry supply chains. *Poult. Sci.* 100, 101157. doi:10.1016/j.psj.2021.101157.
- Gong, C., i Jiang, X. (2017). Application of bacteriophages to reduce Salmonella attachment and biofilms on hard surfaces. *Poult. Sci.* 96, 1838–1848. doi:10.3382/ps/pew463.
- González-Gómez, J. P., González-Torres, B., Guerrero-Medina, P. J., López-Cuevas, O., Chaidez, C., Avila-Novoa, M. G., i in. (2021). Efficacy of Novel Bacteriophages against Escherichia coli Biofilms on Stainless Steel. *Antibiotics* 10, 1150. doi:10.3390/antibiotics10101150.
- Górski, A., Międzybrodzki, R., Łobocka, M., Głowacka-Rutkowska, A., Bednarek, A., Borysowski, J., i in. (2018). Phage Therapy: What Have We Learned? *Viruses* 10, 288. doi:10.3390/v10060288.
- Grakh, K., Mittal, D., Prakash, A., i Jindal, N. (2022). Characterization and antimicrobial susceptibility of biofilm-producing Avian Pathogenic Escherichia coli from broiler chickens and their environment in India. *Vet. Res. Commun.* 46, 537–548. doi:10.1007/s11259-021-09881-5.
- Guabiraba, R., i Schouler, C. (2015). Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 118. doi:10.1093/FEMSLE/FNV118.
- Gualdi, L., Tagliabue, L., Bertagnoli, S., Ieranò, T., De Castro, C., i Landini, P. (2008). Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in Escherichia coli. *Microbiology* 154, 2017–2024. doi:10.1099/mic.0.2008/018093-0.
- Gunduz, G. T., i Tuncel, G. (2006). Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 89, 329–336. doi:10.1007/S10482-005-9035-9/METRICS.
- Guo, Y., Li, J., Islam, M. S., Yan, T., Zhou, Y., Liang, L., i in. (2021). Application of a novel phage vB_SalS-LPSTLL for the biological control of Salmonella in foods. *Food Res. Int.* 147, 110492. doi:10.1016/j.foodres.2021.110492.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., i Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004 22 2, 95–108. doi:10.1038/nrmicro821.

- Hall, C. W., i Mah, T.-F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 276–301. doi:10.1093/femsre/fux010.
- Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, M., Smalla, K., Matthies, M., i Spitteller, M. (2008). Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1892–1900. doi:10.1016/j.soilbio.2008.03.014.
- Hoang Minh, D., Hoang Minh, S., Honjoh, K., i Miyamoto, T. (2016). Isolation and bio-control of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* contamination in raw chicken meat by using lytic bacteriophages. *LWT - Food Sci. Technol.* 71, 339–346. doi:10.1016/j.lwt.2016.04.013.
- Høiby, N., Ciofu, O., i Bjarnsholt, T. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* 5, 1663–1674. doi:10.2217/fmb.10.125.
- Hooton, S. P. T., Atterbury, R. J., i Connerton, I. F. (2011). Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella Typhimurium* U288 contamination on pig skin. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 157–163. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.015.
- Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M., i Donoghue, A. M. (2003). Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. *Poult. Sci.* 82, 1108–1112. doi:10.1093/PS/82.7.1108.
- Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M., i Donoghue, A. M. (2004). Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. *Poult. Sci.* 83, 1944–1947. doi:10.1093/ps/83.12.1944.
- Hunt, S. M., Hamilton, M. A., Sears, J. T., Harkin, G., i Reno, J. (2003). A computer investigation of chemically mediated detachment in bacterial biofilms. *Microbiology* 149, 1155–1163. doi:10.1099/mic.0.26134-0.
- Hunt, S. M., Werner, E. M., Huang, B., Hamilton, M. A., i Stewart, P. S. (2004). Hypothesis for the Role of Nutrient Starvation in Biofilm Detachment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7418–7425. doi:10.1128/AEM.70.12.7418-7425.2004.
- Huq, A., Whitehouse, C. A., Grim, C. J., Alam, M., i Colwell, R. R. (2008). Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19,

244–247. doi:10.1016/J.COPBIO.2008.04.005.

Hyeon, J.-Y., Chon, J.-W., Hwang, I.-G., Kwak, H.-S., Kim, M.-S., Kim, S.-K., i in. (2011). Prevalence, Antibiotic Resistance, and Molecular Characterization of Salmonella Serovars in Retail Meat Products. *J. Food Prot.* 74, 161–166. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-327.

Hyman, P., i Abedon, S. T. (2010). „Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance”, w, 217–248. doi:10.1016/S0065-2164(10)70007-1.

Ievy, S., Islam, M. S., Sobur, M. A., Talukder, M., Rahman, M. B., Khan, M. F. R., i in. (2020). Molecular Detection of Avian Pathogenic Escherichia coli (APEC) for the First Time in Layer Farms in Bangladesh and Their Antibiotic Resistance Patterns. *Microorganisms* 8, 1021. doi:10.3390/microorganisms8071021.

Irie, Y., i Parsek, M. R. (2008). „Quorum Sensing and Microbial Biofilms”, w, 67–84. doi:10.1007/978-3-540-75418-3_4.

Islam, M. S., Zhou, Y., Liang, L., Nime, I., Liu, K., Yan, T., i in. (2019). Application of a Phage Cocktail for Control of Salmonella in Foods and Reducing Biofilms. *Viruses* 11, 841. doi:10.3390/v11090841.

Jassim, S. A. A., Abdulmir, A. S., i Abu Bakar, F. (2012). Novel phage-based bio-processing of pathogenic Escherichia coli and its biofilms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 47–60. doi:10.1007/s11274-011-0791-6.

Jeon, G., i Ahn, J. (2020). Assessment of phage-mediated inhibition of Salmonella Typhimurium treated with sublethal concentrations of ceftriaxone and ciprofloxacin. *FEMS Microbiol. Lett.* 367. doi:10.1093/femsle/fnaa159.

Johar, A., Al-Thani, N., Al-Hadidi, S. H., Dlissi, E., Mahmoud, M. H., i Eltai, N. O. (2021). Antibiotic Resistance and Virulence Gene Patterns Associated with Avian Pathogenic Escherichia coli (APEC) from Broiler Chickens in Qatar. *Antibiotics* 10, 564. doi:10.3390/antibiotics10050564.

Johnson, J. R., i Russo, T. A. (2002). Extraintestinal pathogenic Escherichia coli : “The other bad E coli ”. *J. Lab. Clin. Med.* 139, 155–162. doi:10.1067/MLC.2002.121550.

Johnson, J. R., i Russo, T. A. (2005). Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) Escherichia coli. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 383–404.

doi:10.1016/J.IJMM.2005.07.005.

Johnson, T. J., Jordan, D., Kariyawasam, S., Stell, A. L., Bell, N. P., Wannemuehler, Y. M., i in. (2010). Sequence analysis and characterization of a transferable hybrid plasmid encoding multidrug resistance and enabling zoonotic potential for extraintestinal *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 78, 1931–1942. doi:10.1128/IAI.01174-09.

Jones, F. T. (2011). A review of practical *Salmonella* control measures in animal feed. *J. Appl. Poult. Res.* 20, 102–113. doi:10.3382/japr.2010-00281.

Kaczorowska, J., Casey, E., Lugli, G. A., Ventura, M., Clarke, D. J., van Sinderen, D., i in. (2021). *In Vitro* and *In Vivo* Assessment of the Potential of *Escherichia coli* Phages to Treat Infections and Survive Gastric Conditions. *Microorganisms* 9, 1869. doi:10.3390/microorganisms9091869.

Kalmokoff, M., Lanthier, P., Tremblay, T.-L., Foss, M., Lau, P. C., Sanders, G., i in. (2006). Proteomic Analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 Biofilms Reveals a Role for the Motility Complex in Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* 188, 4312–4320. doi:10.1128/JB.01975-05.

Kathayat, D., Antony, L., Deblais, L., Helmy, Y. A., Scaria, J., i Rajashekara, G. (2020). Small molecule adjuvants potentiate colistin activity and attenuate resistance development in *Escherichia coli* by affecting pmrAB system. *Infect. Drug Resist.* 13, 2205–2222. doi:10.2147/IDR.S260766.

Kemmett, K., Williams, N. J., Chaloner, G., Humphrey, S., Wigley, P., i Humphrey, T. (2014). The contribution of systemic *Escherichia coli* infection to the early mortalities of commercial broiler chickens. *Avian Pathol.* 43, 37–42. doi:10.1080/03079457.2013.866213.

Kimura, S. (1998). Anti-microorganism contamination measures for crude drugs utilizing radiation sterilization.

Koo, J., DePaola, A., i Marshall, D. L. (2000). Effect of Simulated Gastric Fluid and Bile on Survival of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio vulnificus* Phage†. *J. Food Prot.* 63, 1665–1669. doi:10.4315/0362-028X-63.12.1665.

Korber, D. R., Choi, A., Wolfaardt, G. M., Ingham, S. C., i Caldwell, D. E. (1997). Substratum topography influences susceptibility of *Salmonella enteritidis* biofilms to

- trisodium phosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3352–3358.
doi:10.1128/aem.63.9.3352-3358.1997.
- Korf, I. H. E., Kittler, S., Bierbrodt, A., Mengden, R., Rohde, C., Rohde, M., i in. (2020). *In Vitro* Evaluation of a Phage Cocktail Controlling Infections with Escherichia coli. *Viruses* 12, 1470. doi:10.3390/v12121470.
- Korzeniowski, P., Śliwka, P., Kuczkowski, M., Mišić, D., Milcarz, A., i Kuźmińska-Bajor, M. (2022). Bacteriophage Cocktail Can Effectively Control Salmonella Biofilm in Poultry Housing. *Front. Microbiol.* 13. doi:10.3389/fmicb.2022.901770.
- Kroupitski, Y., Pinto, R., Brandl, M. T., Belausov, E., i Sela, S. (2009). Interactions of Salmonella enterica with lettuce leaves. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1876–1885.
doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04152.x.
- Kutter, E., i Sulakvelidze, A. red. (2004). *Bacteriophages*. CRC Press
doi:10.1201/9780203491751.
- Kuźmińska-Bajor, M., Grzymajło, K., i Ugorski, M. (2015). Type 1 fimbriae are important factors limiting the dissemination and colonization of mice by Salmonella Enteritidis and contribute to the induction of intestinal inflammation during Salmonella invasion. *Front. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00276.
- Kuźmińska-Bajor, M., Śliwka, P., Ugorski, M., Korzeniowski, P., Skaradzińska, A., Kuczkowski, M., i in. (2021). Genomic and functional characterization of five novel Salmonella-targeting bacteriophages. *Virol. J.* 18, 183. doi:10.1186/s12985-021-01655-4.
- Landini, P., Antoniani, D., Burgess, J. G., i Nijland, R. (2010). Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 813–823. doi:10.1007/S00253-010-2468-8/TABLES/1.
- Landman, W. J. M., Heuvelink, A., i van Eck, J. H. H. (2013). Reproduction of the Escherichia coli peritonitis syndrome in laying hens.
<http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2013.775694> 42, 157–162.
doi:10.1080/03079457.2013.775694.
- Latou, E., Mexis, S. F., Badeka, A. V., Kontakos, S., i Kontominas, M. G. (2014). Combined effect of chitosan and modified atmosphere packaging for shelf life extension of chicken

- breast fillets. *LWT - Food Sci. Technol.* 55, 263–268. doi:10.1016/j.lwt.2013.09.010.
- Ławniczek-Wałczyk, A., i Górny, R. L. (2022). Biofilm jako zagrożenie w zakładach produkcji i przetwarzania żywności. *Occup. Safety. Sci. Pract.* 606, 10–15. doi:10.54215/BP.2022.03.6.Lawniczek-Walczyk.
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., i Beloin, C. (2014). Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 510–543. doi:10.1128/MMBR.00013-14.
- Leonhard, M., Tobudic, S., Moser, D., Zatorska, B., Bigenzahn, W., i Schneider-Stickler, B. (2013). Growth kinetics of candida biofilm on medical polymers: A long-term *in vitro* study. *Laryngoscope* 123, 732–737. doi:10.1002/lary.23662.
- Leverentz, B., Conway, W. S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W. J., Fuchs, Y., Camp, M. J., i in. (2001). Examination of Bacteriophage as a Biocontrol Method for Salmonella on Fresh-Cut Fruit: A Model Study. *J. Food Prot.* 64, 1116–1121. doi:10.4315/0362-028X-64.8.1116.
- Li, C., Wang, Y., Wang, J., i Wang, X. (2022). Properties of a Novel Salmonella Phage L66 and Its Application Based on Electrochemical Sensor-Combined AuNPs to Detect Salmonella. *Foods* 11, 2836. doi:10.3390/foods11182836.
- Li, M., Shi, D., Li, Y., Xiao, Y., Chen, M., Chen, L., i in. (2020). Recombination of T4-like Phages and Its Activity against Pathogenic Escherichia coli in Planktonic and Biofilm Forms. *Virol. Sin.* 35, 651–661. doi:10.1007/s12250-020-00233-2.
- Li, T., Chen, H., Zhao, J., Tao, Z., Lan, W., Zhao, Y., i in. (2023). Characterization of Phage vB_SalM_SPJ41 and the Reduction of Risk of Antibiotic-Resistant Salmonella enterica Contamination in Two Ready-to-Eat Foods. *Antibiotics* 12, 364. doi:10.3390/antibiotics12020364.
- Liljebjelke, K. A., Hofacre, C. L., Liu, T., White, D. G., Ayers, S., Young, S., i in. (2005). Vertical and Horizontal Transmission of Salmonella Within Integrated Broiler Production System. *Foodborne Pathog. Dis.* 2, 90–102. doi:10.1089/fpd.2005.2.90.
- Lim, T.-H., Kim, M.-S., Lee, D.-H., Lee, Y.-N., Park, J.-K., Youn, H.-N., i in. (2012). Use of bacteriophage for biological control of Salmonella Enteritidis infection in chicken. *Res. Vet. Sci.* 93, 1173–1178. doi:10.1016/j.rvsc.2012.06.004.

- Lindberg, A. A. (1973). Bacteriophage Receptors. *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 205–241.
doi:10.1146/annurev.mi.27.100173.001225.
- Litt, P. K., Kakani, R., Jadeja, R., Saha, J., Kountoupis, T., i Jaroni, D. (2020). Effectiveness of Bacteriophages Against Biofilm-Forming Shiga-Toxicogenic *Escherichia coli* on Leafy Greens and Cucumbers. *PHAGE* 1, 213–222. doi:10.1089/phage.2020.0024.
- Liu, Y., Shi, L., Su, L., Van der Mei, H. C., Jutte, P. C., Ren, Y., i in. (2019). Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. *Chem. Soc. Rev.* 48, 428–446. doi:10.1039/C7CS00807D.
- Łoś, M., i Węgrzyn, G. (2012). „Pseudolysogeny”, w, 339–349. doi:10.1016/B978-0-12-394621-8.00019-4.
- Loussert, C., Schmitt, C., Prevost, M.-C., Balloy, V., Fadel, E., Philippe, B., i in. (2010). In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. *Cell. Microbiol.* 12, 405–410.
doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01409.x.
- Lu, M., Liu, H., Lu, H., Liu, R., i Liu, X. (2020). Characterization and Genome Analysis of a Novel Salmonella Phage vB_SenS_SE1. *Curr. Microbiol.* 77, 1308–1315.
doi:10.1007/s00284-020-01879-7.
- Lutful Kabir, S. M. (2010). Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* 2010, Vol. 7, Pages 89-114 7, 89–114.
doi:10.3390/IJERPH7010089.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., i Herman, L. (2012). Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11, 133–147.
doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x.
- Markland, S. M., LeStrange, K. J., Sharma, M., i Kniel, K. E. (2015). Old Friends in New Places: Exploring the Role of Extraintestinal *E. coli* in Intestinal Disease and Foodborne Illness. *Zoonoses Public Health* 62, 491–496. doi:10.1111/zph.12194.
- Matthijs, M. G. R., Ariaans, M. P., Dwars, R. M., van Eck, J. H. H., Bouma, A., Stegeman, A., i in. (2009). Course of infection and immune responses in the respiratory tract of IBV infected broilers after superinfection with *E. coli*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127, 77–

84. doi:10.1016/J.VETIMM.2008.09.016.
- McEwen, S. A., i Fedorka-Cray, P. J. (2002). Antimicrobial Use and Resistance in Animals. *Clin. Infect. Dis.* 34, S93–S106. doi:10.1086/340246.
- Mellata, M. (2013). Human and Avian Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli: Infections, Zoonotic Risks, and Antibiotic Resistance Trends. <https://home.liebertpub.com/fpd> 10, 916–932. doi:10.1089/FPD.2013.1533.
- Mezal, E. H., Sabol, A., Khan, M. A., Ali, N., Stefanova, R., i Khan, A. A. (2014). Isolation and molecular characterization of Salmonella enterica serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. *Food Microbiol.* 38, 67–74. doi:10.1016/J.FM.2013.08.003.
- Mizel, S. B., Kucera, L. S., Richardson, S. H., Ciacci, F., i Iyer, N. P. (1995). Regulation of macrophage activation and human immunodeficiency virus production by invasive Salmonella strains. *Infect. Immun.* 63, 1820–1826. doi:10.1128/IAI.63.5.1820-1826.1995.
- Montso, P. K., Mlambo, V., i Ateba, C. N. (2021). Efficacy of novel phages for control of multi-drug resistant Escherichia coli O177 on artificially contaminated beef and their potential to disrupt biofilm formation. *Food Microbiol.* 94, 103647. doi:10.1016/j.fm.2020.103647.
- Montville, T. J., i Matthews, K. R. (2014). „Physiology, Growth, and Inhibition of Microbes in Foods”, w *Food Microbiology* (Washington, DC, USA: ASM Press), 1–18. doi:10.1128/9781555818463.ch1.
- Mosimann, S., Desiree, K., i Ebner, P. (2021). Efficacy of phage therapy in poultry: A systematic review and meta-analysis. *Poult. Sci.*, 101472. doi:10.1016/j.psj.2021.101472.
- Moulin-Schouleur, M., Réperant, M., Laurent, S., Brée, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., i in. (2007). Extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3366–3376. doi:10.1128/JCM.00037-07/ASSET/1A260BB2-8628-41FF-B89F-0C76508F63C5/ASSETS/GRAPHIC/ZJM0100776100003.JPEG.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., i Lewenza, S. (2008). Extracellular DNA Chelates

- Cations and Induces Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS Pathog.* 4, e1000213. doi:10.1371/journal.ppat.1000213.
- Munita, J. M., i Arias, C. A. (2016). „Mechanisms of Antibiotic Resistance”, w *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* (Washington, DC, USA: ASM Press), 481–511. doi:10.1128/9781555819286.ch17.
- Nagaraja, K. V., Emery, D. A., Newman, J. A., i Pomeroy, B. S. (1983). Identification and isolation of somatic pili from pathogenic *Escherichia coli* of turkeys. *Am. J. Vet. Res.* 44, 284–287. Available at: <https://europepmc.org/article/med/6131633> [Udostępniono maj 22, 2023].
- Neu, J., i Walker, W. A. (2011). Necrotizing Enterocolitis. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1005408> 364, 255–264. doi:10.1056/NEJMRA1005408.
- Nickerson, K. P., Chanin, R. B., Sistrunk, J. R., Rasko, D. A., Fink, P. J., Barry, E. M., i in. (2017). Analysis of *Shigella flexneri* Resistance, Biofilm Formation, and Transcriptional Profile in Response to Bile Salts. *Infect. Immun.* 85. doi:10.1128/IAI.01067-16.
- Nie, W., Wang, J., Xu, J., Yao, L., Qiao, D., Xue, F., i in. (2020). A molecule capturer analysis system for visual determination of avian pathogenic *Escherichia coli* serotype O78 using a lateral flow assay. *Microchim. Acta* 187, 1–7. doi:10.1007/S00604-020-4170-6/FIGURES/3.
- Nielsen, D. W., Ricker, N., Barbieri, N. L., Allen, H. K., Nolan, L. K., i Logue, C. M. (2020). Outer membrane protein A (OmpA) of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *BMC Res. Notes* 13, 1–7. doi:10.1186/S13104-020-4917-5/FIGURES/3.
- Nolan, L. K., John, B. H., Vaillancourt, J. P., Abdul-Aziz, T., i Logue, C. M. (2017). Colibacillosis. *Dis. Poult. Thirteen. Ed.*, 751–805. doi:10.1002/9781119421481.CH18.
- Oliveira, A., Sereno, R., i Azeredo, J. (2010). In vivo efficiency evaluation of a phage cocktail in controlling severe colibacillosis in confined conditions and experimental poultry houses. *Vet. Microbiol.* 146, 303–308. doi:10.1016/j.vetmic.2010.05.015.
- Olsén, A., Arnqvist, A., Hammar, M., Sukupolvi, S., i Normark, S. (1993). The RpoS Sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 7, 523–536. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01143.x.

- Olsen, R. H., Frantzen, C., Christensen, H., i Bisgaard, M. (2012). An Investigation on First-Week Mortality in Layers. *Avian Dis.* 56, 51–57. doi:10.1637/9777-051011-REG.1.
- Oosterik, L. H., Tuntufye, H. N., Butaye, P., i Goddeeris, B. M. (2014). Effect of serogroup, surface material and disinfectant on biofilm formation by avian pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. J.* 202, 561–565. doi:10.1016/j.tvjl.2014.10.001.
- Orsinger-Jacobsen, S. J., Patel, S. S., Vellozzi, E. M., Gialanella, P., Nimrichter, L., Miranda, K., i in. (2013). Use of a stainless steel washer platform to study *Acinetobacter baumannii* adhesion and biofilm formation on abiotic surfaces. *Microbiology* 159, 2594–2604. doi:10.1099/mic.0.068825-0.
- Park, H., Kim, J., Kim, H., Cho, E., Park, H., Jeon, B., i in. (2023). Characterization of the lytic phage MSP1 for the inhibition of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovars Thompson and its biofilm. *Int. J. Food Microbiol.* 385, 110010. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110010.
- Park, M. O., Ikenaga, H., i Watanabe, K. (2007). Phage diversity in a methanogenic digester. *Microb. Ecol.* 53, 98–103. doi:10.1007/S00248-006-9053-9/FIGURES/3.
- Patel, J., i Sharma, M. (2010). Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 41–47. doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.02.005.
- Patrick, M. E., Adcock, P. M., Gomez, T. M., Altekruze, S. F., Holland, B. H., Tauxe, R. V., i in. (2004). *Salmonella* Enteritidis Infections, United States, 1985–1999. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1. doi:10.3201/EID1001.020572.
- Pearce, P., Song, B., Skinner, D. J., Mok, R., Hartmann, R., Singh, P. K., i in. (2019). Flow-Induced Symmetry Breaking in Growing Bacterial Biofilms. *Phys. Rev. Lett.* 123, 258101. doi:10.1103/PHYSREVLETT.123.258101/FIGURES/3/MEDIUM.
- Possas, A., Valero, A., García-Gimeno, R. M., Pérez-Rodríguez, F., i Mendes de Souza, P. (2021). Combining UV-C technology and caffeine application to inactivate *Escherichia coli* on chicken breast fillets. *Food Control* 129, 108206. doi:10.1016/j.foodcont.2021.108206.
- Poulsen, L. L., Kudirkiene, E., Jørgensen, S. L., Djordjevic, S. P., Cummins, M. L., Christensen, J. P., i in. (2020). Whole genome sequence comparison of avian pathogenic

- Escherichia coli from acute and chronic salpingitis of egg laying hens. *BMC Vet. Res.* 16, 1–9. doi:10.1186/S12917-020-02369-5/FIGURES/3.
- Powell, L. F., Lawes, J. R., Clifton-Hadley, F. A., Rodgers, J., Hariis, K., Evans, S. J., i in. (2012). The prevalence of *Campylobacter* spp. in broiler flocks and on broiler carcasses, and the risks associated with highly contaminated carcasses. *Epidemiol. Infect.* 140, 2233–2246. doi:10.1017/S0950268812000040.
- Rakonjac, J., Bennett, N. J., Spagnuolo, J., Gagic, D., i Russel, M. (2011). Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr. Issues Mol. Biol.* 13, 51–76. doi:10.21775/cimb.013.051.
- Ramirez, K., Cazarez-Montoya, C., Lopez-Moreno, H. S., i Castro-del Campo, N. (2018). Bacteriophage cocktail for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7: Stability and potential allergenicity study. *PLoS One* 13, e0195023. doi:10.1371/journal.pone.0195023.
- Reeser, R. J., Medler, R. T., Billington, S. J., Jost, B. H., i Joens, L. A. (2007). Characterization of *Campylobacter jejuni* Biofilms under Defined Growth Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1908–1913. doi:10.1128/AEM.00740-06.
- Reuter, M., Mallett, A., Pearson, B. M., i van Vliet, A. H. M. (2010). Biofilm Formation by *Campylobacter jejuni* Is Increased under Aerobic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2122–2128. doi:10.1128/AEM.01878-09.
- Reynolds, T. B., i Fink, G. R. (2001). Bakers' Yeast, a Model for Fungal Biofilm Formation. *Science (80-.)*. 291, 878–881. doi:10.1126/science.291.5505.878.
- Ribeiro, K. V. G., Ribeiro, C., Dias, R. S., Cardoso, S. A., de Paula, S. O., Zanoncio, J. C., i in. (2018). Bacteriophage Isolated from Sewage Eliminates and Prevents the Establishment of *Escherichia Coli* Biofilm. *Adv. Pharm. Bull.* 8, 85–95. doi:10.15171/apb.2018.011.
- Riedel, C. U., Casey, P. G., Mulcahy, H., O'Gara, F., Gahan, C. G. M., i Hill, C. (2007). Construction of p16Slux, a novel vector for improved bioluminescent labeling of gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7092–7095. doi:10.1128/AEM.01394-07.
- Rode, T. M., Langsrud, S., Holck, A., i Møretro, T. (2007). Different patterns of biofilm

- formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 372–383. doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2007.02.017.
- Rodrigues, S. V., Laviniki, V., Borges, K. A., Furian, T. Q., Moraes, H. L. S., Nascimento, V. P., i in. (2019). Biofilm Formation by Avian Pathogenic *Escherichia coli* is Not Related to In Vivo Pathogenicity. *Curr. Microbiol.* 76, 194–199. doi:10.1007/s00284-018-1608-8.
- Roll, V. F. B., Dai Prá, M. A., i Roll, A. P. (2011). Research on *Salmonella* in broiler litter reused for up to 14 consecutive flocks. *Poult. Sci.* 90, 2257–2262. doi:10.3382/PS.2011-01583.
- Römling, U., i Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J. Intern. Med.* 272, 541–561. doi:10.1111/joim.12004.
- Rotger Anglada, R., i Casadesús Pursals, J. (1999). The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int. Microbiol. Off. J. Spanish Soc. Microbiol. ISSN 1139-6709, Vol. 2, Nº. 3, 1999, págs. 177-184* 2, 177–184. Available at: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5424773&info=resumen&idioma=ENG> [Udostępniono maj 22, 2023].
- Ruan, X., Deng, X., Tan, M., Wang, Y., Hu, J., Sun, Y., i in. (2021). Effect of resveratrol on the biofilm formation and physiological properties of avian pathogenic *Escherichia coli*. *J. Proteomics* 249, 104357. doi:10.1016/j.jprot.2021.104357.
- Russo, T. A., i Johnson, J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 5, 449–456. doi:10.1016/S1286-4579(03)00049-2.
- Sadekuzzaman, M., Mizan, M. F. R., Yang, S., Kim, H.-S., i Ha, S.-D. (2018). Application of bacteriophages for the inactivation of *Salmonella* spp. in biofilms. *Food Sci. Technol. Int.* 24, 424–433. doi:10.1177/1082013218763424.
- Saif, Y., Barnes, H. J., Glisson, J. R., Fadly, A. M., McDougald, L. R., i Swayne, D. E. (2003). Diseases of poultry. *Dis. poultry.*
- Salmond, G. P. C., i Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015 1312 13, 777–786. doi:10.1038/nrmicro3564.
- Samad, A. (2022). Antibiotics Resistance in Poultry and its Solution. *Devot. J. Community*

- Serv.* 3, 999–1020. doi:10.36418/DEV.V3I10.206.
- Santos, R. L., Zhang, S., Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Garry Adams, L., i Bäumlner, A. J. (2001). Animal models of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect.* 3, 1335–1344. doi:10.1016/S1286-4579(01)01495-2.
- Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A. H., Davies, D. G., i Gilbert, P. (2004). Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. *J. Bacteriol.* 186, 7312–7326. doi:10.1128/JB.186.21.7312-7326.2004.
- Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K., i Bisht, R. (2019). Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian J. Microbiol.* 59, 3–12. doi:10.1007/S12088-018-0757-6/TABLES/1.
- Shang, Y., Sun, Q., Chen, H., Wu, Q., Chen, M., Yang, S., i in. (2021). Isolation and Characterization of a Novel Salmonella Phage vB_SalP_TR2. *Front. Microbiol.* 12. doi:10.3389/fmicb.2021.664810.
- Sharma, M., Patel, J. R., Conway, W. S., Ferguson, S., i Sulakvelidze, A. (2009). Effectiveness of Bacteriophages in Reducing *Escherichia coli* O157:H7 on Fresh-Cut Cantaloupes and Lettuce. *J. Food Prot.* 72, 1481–1485. doi:10.4315/0362-028X-72.7.1481.
- Sharma, M., Ryu, J.-H., i Beuchat, L. R. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. *J. Appl. Microbiol.* 99, 449–459. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02659.x.
- Sheldon, I. M., Rycroft, A. N., Dogan, B., Craven, M., Bromfield, J. J., Chandler, A., i in. (2010). Specific Strains of *Escherichia coli* Are Pathogenic for the Endometrium of Cattle and Cause Pelvic Inflammatory Disease in Cattle and Mice. *PLoS One* 5, e9192–e9192. Available at: <https://go.gale.com/ps/i.do?p=AONE&sw=w&issn=19326203&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA473914778&sid=googleScholar&linkaccess=fulltext> [Udostępniono maj 22, 2023].
- Shpigel, N. Y., Elazar, S., i Rosenshine, I. (2008). Mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 60–65. doi:10.1016/J.MIB.2008.01.004.
- Simmons, E. L., Drescher, K., Nadell, C. D., i Bucci, V. (2018). Phage mobility is a core

- determinant of phage–bacteria coexistence in biofilms. *ISME J.* 12, 531–543.
doi:10.1038/ismej.2017.190.
- Simões, M., Simões, L. C., i Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 573–583.
doi:10.1016/j.lwt.2009.12.008.
- Siringan, P., Connerton, P. L., Payne, R. J. H., i Connerton, I. F. (2011). Bacteriophage-Mediated Dispersal of *Campylobacter jejuni* Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3320–3326. doi:10.1128/AEM.02704-10.
- Sivaranjani, M., McCarthy, M. C., Sniatynski, M. K., Wu, L., Dillon, J.-A. R., Rubin, J. E., i in. (2022). Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *E. coli* Associated With Colibacillosis Outbreaks in Broiler Chickens From Saskatchewan. *Front. Microbiol.* 13. doi:10.3389/fmicb.2022.841516.
- Skarżyńska, M., Zając, M., i Wasyl, D. (2020). Antybiotyki i bakterie: mechanizmy działania i strategie oporności. *Postępy Mikrobiol.* 59, 49–62. doi:10.21307/PM-2020.59.1.005.
- Sklar, I. B., i Joerger, R. D. (2001). Attempts To Utilize Bacteriophage To Combat *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis Infection In Chickens. *J. Food Saf.* 21, 15–29. doi:10.1111/j.1745-4565.2001.tb00305.x.
- Skyberg, J. A., Siek, K. E., Doetkott, C., i Nolan, L. K. (2007). Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *J. Appl. Microbiol.* 102. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03076.x.
- Smith, J. L., Fratamico, P. M., i Gunther, N. W. (2007). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog. Dis.* 4, 134–163. doi:10.1089/fpd.2007.0087.
- Sneeringer, S., MacDonald, J. M., Key, N., McBride, W. D., i Mathews, K. (2017). Economics of Antibiotic Use in U.S. Livestock Production. Available at: <https://papers.ssrn.com/abstract=2981692> [Udostępniono maj 22, 2023].
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.-M., Gamazo, C., i in. (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* 43, 793–808. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02802.x.
- Sridevi Dhanarani, T., Shankar, C., Park, J., Dexilin, M., Rajesh Kumar, R., i Thamaraiselvi, K. (2009). Study on acquisition of bacterial antibiotic resistance determinants in poultry

- litter. *Poult. Sci.* 88, 1381–1387. doi:10.3382/PS.2008-00327.
- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L., i Svabic-Vlahovic, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 428–432. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x.
- Subedi, M., Luitel, H., Devkota, B., Bhattarai, R. K., Phuyal, S., Panthi, P., i in. (2018). Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. *BMC Vet. Res.* 14, 113. doi:10.1186/s12917-018-1442-z.
- Summers, W. C. (2003). Bacteriophage Therapy. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.437> 55, 437–451. doi:10.1146/ANNUREV.MICRO.55.1.437.
- Sun, L., Liao, K., i Wang, D. (2015). Effects of Magnolol and Honokiol on Adhesion, Yeast-Hyphal Transition, and Formation of Biofilm by *Candida albicans*. *PLoS One* 10, e0117695. doi:10.1371/journal.pone.0117695.
- Sun, M., i Serwer, P. (1997). The Conformation of DNA Packaged in Bacteriophage G. *Biophys. J.* 72, 958–963. doi:10.1016/S0006-3495(97)78730-7.
- Sun, Z., Xi, J., Yang, C., i Cong, W. (2022). Quorum sensing regulation methods and their effects on biofilm in biological waste treatment systems: A review. *Front. Environ. Sci. Eng.* 16, 87. doi:10.1007/s11783-021-1495-2.
- Suzuki, S. (1994). Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry. *Int. J. Food Microbiol.* 21, 89–105. doi:10.1016/0168-1605(94)90203-8.
- Svensson, S. L., Pryjma, M., i Gaynor, E. C. (2014). Flagella-Mediated Adhesion and Extracellular DNA Release Contribute to Biofilm Formation and Stress Tolerance of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One* 9, e106063. doi:10.1371/journal.pone.0106063.
- Tajik, H., Moradi, M., Alipour, M., i Ghasemmahdi, H. (2018). Biofilm Formation of *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel in Red Meat Model and the Effect of Bacteriophage on Bacterial Biofilm. *Iran. J. Med. Microbiol.* 12, 179–188. doi:10.30699/IJMM.12.3.179.
- Tang, F., Zhang, P., Zhang, Q., Xue, F., Ren, J., Sun, J., i in. (2019). Isolation and characterization of a broad-spectrum phage of multiple drug resistant *Salmonella* and its

- therapeutic utility in mice. *Microb. Pathog.* 126, 193–198.
doi:10.1016/j.micpath.2018.10.042.
- Thanki, A. M., Clavijo, V., Healy, K., Wilkinson, R. C., Sicheritz-Pontén, T., Millard, A. D., i in. (2022). Development of a Phage Cocktail to Target Salmonella Strains Associated with Swine. *Pharmaceuticals* 15, 58. doi:10.3390/ph15010058.
- The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020 (2022). *EFSA J.* 20.
doi:10.2903/j.efsa.2022.7209.
- Thomas, M. E., Klinkenberg, D., Ejeta, G., Van Knapen, F., Bergwerff, A. A., Stegeman, J. A., i in. (2009). Quantification of horizontal transmission of Salmonella enterica serovar enteritidis bacteria in pair-housed groups of laying hens. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6361–6366. doi:10.1128/AEM.00961-09/SUPPL_FILE/APPENDICES_AEM_961_09.DOC.
- Thomson, N. R., Clayton, D. J., Windhorst, D., Vernikos, G., Davidson, S., Churcher, C., i in. (2008). Comparative genome analysis of Salmonella Enteritidis PT4 and Salmonella Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.* 18, 1624–1637. doi:10.1101/GR.077404.108.
- Thormann, K. M., Saville, R. M., Shukla, S., i Spormann, A. M. (2005). Induction of Rapid Detachment in Shewanella oneidensis MR-1 Biofilms. *J. Bacteriol.* 187, 1014–1021.
doi:10.1128/JB.187.3.1014-1021.2005.
- Townsley, L., i Shank, E. A. (2017). Natural-Product Antibiotics: Cues for Modulating Bacterial Biofilm Formation. *Trends Microbiol.* 25, 1016–1026.
doi:10.1016/j.tim.2017.06.003.
- U.S. Food and Drug Administration Available at: <https://www.fda.gov/> [Udostępniono maj 22, 2023].
- Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wieczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., i in. (2022). Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. *Antibiotics* 11, 1079.
doi:10.3390/antibiotics11081079.
- Van Goethem, M. W., Pierneef, R., Bezuidt, O. K. I., Van De Peer, Y., Cowan, D. A., i Makhalanyane, T. P. (2018). A reservoir of ‘historical’ antibiotic resistance genes in

- remote pristine Antarctic soils. *Microbiome* 6, 40. doi:10.1186/s40168-018-0424-5.
- Van Nieuwenhuysse, B., Galant, C., Brichard, B., Docquier, P.-L., Djebara, S., Pirnay, J.-P., i in. (2021). A Case of In Situ Phage Therapy against *Staphylococcus aureus* in a Bone Allograft Polymicrobial Biofilm Infection: Outcomes and Phage-Antibiotic Interactions. *Viruses* 13, 1898. doi:10.3390/v13101898.
- van Regenmortel, M. H. V., Ackermann, H. W., Calisher, C. H., Dietzgen, R. G., Horzinek, M. C., Keil, G. M., i in. (2013). Virus species polemics: 14 senior virologists oppose a proposed change to the ICTV definition of virus species. *Arch. Virol.* 158, 1115–1119. doi:10.1007/S00705-012-1583-5/FIGURES/1.
- Vandemaele, F., Assadzadeh, A., Derijcke, J., Vereecken, M., i Goddeeris, B. M. (2002). [Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)]. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 127, 582–588. Available at: <https://europepmc.org/article/med/12389466> [Udostępniono maj 22, 2023].
- Vaz, C. S. L., Voss-Rech, D., Alves, L., Coldebella, A., Brentano, L., i Trevisol, I. M. (2020). Effect of time of therapy with wild-type lytic bacteriophages on the reduction of *Salmonella* Enteritidis in broiler chickens. *Vet. Microbiol.* 240, 108527. doi:10.1016/j.vetmic.2019.108527.
- Vestby, L. K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E., i Nesse, L. L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Vet. Res.* 5, 20. doi:10.1186/1746-6148-5-20.
- Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., i 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 Microbiol.* 28, 149–157. doi:10.1016/j.fm.2010.09.009.
- Vikram, A., Tokman, J. I., Woolston, J., i Sulakvelidze, A. (2020). Phage Biocontrol Improves Food Safety by Significantly Reducing the Level and Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in Various Foods. *J. Food Prot.* 83, 668–676. doi:10.4315/0362-028X.JFP-19-433.
- Vinner, Richards, Leppanen, Sagona, i Malik (2019). Microencapsulation of Enteric Bacteriophages in a pH-Responsive Solid Oral Dosage Formulation Using a Scalable Membrane Emulsification Process. *Pharmaceutics* 11, 475. doi:10.3390/pharmaceutics11090475.

- Wagenaar, J. A., Mevius, D. J., i Havelaar, A. H. (2006). Campylobacter in primary animal production and control strategies to reduce the burden of human campylobacteriosis. *Rev. Sci. Tech. - Off. Int. des Epizoot.* 25, 581–594. Available at: <https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/407270> [Udostępniono maj 22, 2023].
- Wang, C., Hang, H., Zhou, S., Niu, Y. D., Du, H., Stanford, K., i in. (2020). Bacteriophage biocontrol of Shiga toxigenic Escherichia coli (STEC) O145 biofilms on stainless steel reduces the contamination of beef. *Food Microbiol.* 92, 103572. doi:10.1016/j.fm.2020.103572.
- Ward, L. R., Threlfall, J., Smith, H. R., i O'Brien, S. J. (2000). Salmonella enteritidis Epidemic. *Science (80-)*. 287, 1753–1753. doi:10.1126/SCIENCE.287.5459.1753C.
- Watnick, P., i Kolter, R. (2000). Biofilm, City of Microbes. *J. Bacteriol.* 182, 2675–2679. doi:10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000.
- Weinbauer, M. G., i Rassoulzadegan, F. (2003). Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environ. Microbiol.* 6, 1–11. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00539.x.
- Willey, J. M., i Van Der Donk, W. A. (2007). Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093501> 61, 477–501. doi:10.1146/ANNUREV.MICRO.61.080706.093501.
- Wong, C. L., Sieo, C. C., Tan, W. S., Abdullah, N., Hair-Bejo, M., Abu, J., i in. (2014). Evaluation of a lytic bacteriophage, Φ st1, for biocontrol of Salmonella enterica serovar Typhimurium in chickens. *Int. J. Food Microbiol.* 172, 92–101. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.034.
- Woodward, M. J., Sojka, M., Springis, K. A., i Humphrey, T. J. (2000). The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of Salmonella enterica serotype Enteritidis to inanimate surfaces. *J. Med. Microbiol.* 49, 481–487. doi:10.1099/0022-1317-49-5-481.
- World Health Organization (WHO) Available at: <https://www.who.int/> [Udostępniono maj 22, 2023].
- Yin, H., Li, J., Huang, H., Wang, Y., Qian, X., Ren, J., i in. (2021). Microencapsulated phages show prolonged stability in gastrointestinal environments and high therapeutic efficiency to treat Escherichia coli O157:H7 infection. *Vet. Res.* 52, 118. doi:10.1186/s13567-021-00991-1.

- Yoke-Kqueen, C., Learn-Han, L., Noorzaleha, A. S., Son, R., Sabrina, S., Jiun-Horng, S., i in. (2008). Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* isolated from indigenous vegetables and poultry in Malaysia. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 318–324. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02311.x.
- Zhang, L., i Foxman, B. (2003). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* mediated urinary tract infections. *Front. Biosci.* 8, 235–244. doi:10.2741/1007/PDF.
- Zhu, B., Macleod, L. C., Kitten, T., i Xu, P. (2018). *Streptococcus sanguinis* biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future Microbiol.* 13, 915–932. doi:10.2217/fmb-2018-0043.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., i Romling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 39, 1452–1463. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x.