

Temat rozprawy doktorskiej: Biofilmy w produkcji żywności i rola bakteriofagów w ich eradykacji

Promotor: prof. dr. hab. inż. Waldemar Rymowicz

Dziedzina nauki: Nauki ścisłe i przyrodnicze

Dyscyplina: Nauki biologiczne

Słowa kluczowe: Biofilm, Bakteriofag, *Salmonella*, *Escherichia coli*, Eradykacja, Produkcja żywności

Słowa kluczowe ang.: Biofilm, Bacteriophage *Salmonella*, *Escherichia coli*, Eradication, Food production

Streszczenie

Pałeczki z rodziny *Enerobacteriaceae*, 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 przeciwdrobnoustrowymi. 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 biofilmów 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 poidel. 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 tworzonych 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.