

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno–Spożywczego
im. prof. Waclawa Dąbrowskiego – Państwowy Instytut
Badawczy

mgr inż. Michał Jakub Wójcicki

**Wykorzystanie potencjału bakteriofagów
w biokontroli wybranych bakterii z rzędu
Enterobacterales występujących w łańcuchu
żywnościowym**

Using the potential of bacteriophages in the biocontrol of selected bacteria
from *Enterobacterales* order present in the food chain

Praca doktorska
Doctoral thesis

Promotorzy:

dr hab. Edyta Juszczyk-Kubiak, prof. IBPRS–PIB
dr hab. inż. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS–PIB
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno–Spożywczego
im. prof. Waclawa Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Mikrobiologii

Recenzenci:

dr hab. inż. Anna Bzducha-Wróbel
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Instytut Nauk o Żywności
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

dr hab. Ewa Jończyk-Matysiak
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
Zakład Terapii Fagowej
Laboratorium Bakteriofagowe

dr hab. Marcin Schmidt, prof. UPP
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Warszawa 2023

Składam serdeczne podziękowania moim Promotorkom, dr hab. Edycie Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS–PIB oraz dr hab. inż. Barbarze Sokotowskiej, prof. IBPRS–PIB, za możliwość rozwoju moich zainteresowań naukowych, poparcie nowych pomysłów i wspieranie przy ich realizacji, mobilizację i merytoryczną pomoc przy przygotowaniu niniejszej pracy.

Szczególne podziękowania składam moim wieloletnim Opiekunom Naukowym i Promotorom prac dyplomowych, prof. dr. hab. inż. Stanisławowi Błażejowskiemu oraz dr hab. inż. Iwoni Gientce, prof. SGGW, z których pomocą ukierunkowałem swoje zainteresowania naukowe i rozpocząłem pracę naukową.

Dziękuję mgr inż. Oldze Świder oraz mgr Paulinie Średnickiej za wsparcie i nieocenioną pomoc przy realizacji badań do niniejszej pracy.

Dziękuję również pozostałym współpracownikom z Zakładu Mikrobiologii IBPRS–PIB za pomoc i koleżeńską atmosferę.

Składam podziękowania moim Najbliższym za wsparcie i wyrozumiałość.

Niniejszą pracę dedykuję moim Dziadkom, Elżbiecie i Jerzemu Pogodzińskim, oraz mojej Mamie.

Oświadczenie promotorów pracy

Oświadczamy, że niniejsza praca została przygotowana pod naszym kierunkiem i stwierdzamy, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora.

Data

Podpis promotora pracy

Data

Podpis promotora pracy

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska przygotowana przeze mnie nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni lub innej uprawnionej instytucji naukowej.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora pracy

Streszczenie

Wykorzystanie potencjału bakteriofagów w biokontroli wybranych bakterii z rzędu *Enterobacterales* występujących w łańcuchu żywnościowym

Konwencjonalne metody utrwalania nie zawsze skutecznie zapewniają jakość i bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności minimalnie przetworzonej pochodzenia roślinnego, dlatego poszukuje się nowych alternatyw. Zastosowanie bakteriofagów może spełnić oczekiwania konsumentów dotyczące żywności o minimalnym stopniu przetworzenia poprzez wydłużenie jej okresu przydatności do spożycia bez wpływu na zmiany właściwości fizycznych oraz zawartość składników bioaktywnych. Dlatego, stawiając za główny cel ocenę możliwości wykorzystania bakteriofagów litycznych w biokontroli żywności minimalnie przetworzonej pochodzenia roślinnego, określono skalę problemu występowania szczepów antybiotykoopornych w łańcuchu żywnościowym oraz podjęto próbę wyizolowania i scharakteryzowania autochtonicznych, wirulentnych bakteriofagów ukierunkowanych na eradykację tych bakterii.

Wśród bakterii saprofitycznych prawie 20% stanowiły szczepy wielolekooporne (MDR), co wskazuje na konieczność monitorowania antybiotykooporności w łańcuchu żywnościowym. Pałeczki z rodzaju *Salmonella* wykazały fenotypową oporność na wiele antybiotyków (ponad 50% szczepów MDR) i kodowały liczne geny związane z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe (ARGs). Duża liczba bakterii opornych z rodzaju *Salmonella* w połączeniu z wieloma ARGs potwierdziła wieloletnie nieracjonalne stosowanie antybiotyków. Analiza genomów nowo wyizolowanych bakteriofagów wykazała brak sekwencji genów kodujących czynniki wirulencji i toksyn, a więc można je sklasyfikować jako bakteriofagi obligatoryjnie lityczne. Zastosowanie koktajlu fagowego w trzech testowanych produktach (tj. rukoli, mieszance sałat z marchewką oraz mieszance sałat z burakiem) skutecznie ograniczyło rozwój bakterii saprofitycznych podczas przechowywania (redukcja nawet o 99,9% w porównaniu do prób kontrolnych). Nie zaobserwowano pozytywnego wpływu zastosowanego koktajlu fagowego na redukcję liczby bakterii w dwóch rodzajach szpinaku, co może świadczyć o niedostatecznej w stosunku do mikrobioty bakteryjnej produktu bioróżnorodności fagów w opracowanym biopreparacie. Zastosowanie bakteriofagów do utrwalania soków warzywno-owocowych istotnie (o 90%) obniżyło poziom zanieczyszczenia pałeczkami *Salmonella* w porównaniu z sokami kontrolnymi.

Charakterystyka zjadliwości i brak możliwych czynników wirulencji sprawiają, że nowo wyizolowane bakteriofagi mogą w przyszłości stać się potencjalnymi kandydatami do biokontroli żywności.

Słowa kluczowe: bakteriofagi, jakość żywności, bezpieczeństwo żywności, *Salmonella* spp., bakterie saprofityczne, antybiotykooporność, biokontrola, żywność minimalnie przetworzona

Abstract

Using the potential of bacteriophages in the biocontrol of selected bacteria from *Enterobacterales* order present in the food chain

Conventional preservation methods are not always effectively ensure the quality and microbiological safety of plant-based minimally processed food, therefore developing alternative methods is being sought. Bacteriophage biocontrol is a promising natural method of food preservation and food safety. Bacteriophages can enhance food safety by reducing the risk of bacterial contamination and extending the shelf life without significantly affecting the sensory attributes and nutritional content of the food products. Therefore, the bacteriophage-based method can meet consumer expectations. The main goal of the doctoral thesis was to assess the possibility of using lytic bacteriophages in the biocontrol of plant-based minimally processed food. The research was divided into three tasks: 1) the occurrence of antibiotic resistant bacterial strains in the food chain; 2) the isolation and morphological and genomic characterization of autochthonous, virulent bacteriophages; 3) the application of phage cocktail to eradicate bacterial contamination in minimally processed plant-based food products.

Among saprophytic bacteria, almost 20% were multidrug resistant (MDR) strains, which indicates the need to monitor antibiotic resistance in the food chain. *Salmonella* strains showed phenotypic resistance to many antibiotics (over 50% of MDR strains) and encoded numerous genes associated with antimicrobial resistance (ARGs). A large number of resistant bacteria of the *Salmonella* genus combined with many ARGs indicate many years of irrational use of antibiotics. Genome analysis of the newly isolated bacteriophages showed a lack of genes encoding virulence and toxin factors, so they can be classified as obligate lytic bacteriophages. Application of a phage cocktail in the three tested products (i.e. *rucola*, mixed leaf salad with carrot and mixed leaf salad with beetroot) effectively limited the development of the saprophytic bacteria during storage (reduction by up to 99.9% compared to control samples). No positive effect of the phage cocktail to reduce the bacterial counts observed in the two types of spinach may indicate that its biodiversity was insufficient in relation to the bacterial microbiota present in this product. However, the significant effect of the phage cocktail on the reduction of *Salmonella* contamination in vegetable and fruit juices (90%) compared to the control juices has been noticed.

In summary, lytic properties and the lack of possible virulence factors suggest that the newly isolated bacteriophages could be potential candidates for food biocontrol in the future.

Keywords: bacteriophages, food quality, food safety, *Salmonella* spp., saprophytic bacteria, antibiotic resistance, biocontrol, minimally processed food

SPIS TREŚCI

WSTĘP	11
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	13
1. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO PRZEDKŁADANEGO DO OCENY	17
2. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA	21
2.1. Żywność o minimalnym stopniu przetworzenia	21
2.1.1. Zagrożenia mikrobiologiczne w minimalnie przetworzonych produktach roślinnych	22
2.1.2. Metody utrwalania żywności minimalnie przetworzonej	24
2.2. Żywność jako wektor bakterii antybiotykoopornych	27
2.2.1. Antybiotyki i mechanizm ich działania	29
2.2.2. Antybiotykooporność i mechanizmy oporności pałeczek z rzędu <i>Enterobacterales</i>	30
2.2.3. Naturalna oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe pałeczek z rzędu <i>Enterobacterales</i>	31
2.3. Bakteriofagi jako naturalna metoda biokontroli mikrobioty bakteryjnej w żywności	31
2.3.1. Klasyfikacja bakteriofagów	32
2.3.2. Cykle infekcji fagowych	33
2.3.3. Korzyści i zagrożenia związane z wykorzystaniem bakteriofagów w przemyśle spożywczym	36
2.3.4. Aspekty prawne związane z wykorzystaniem bakteriofagów w przemyśle rolno-spożywczym	39
3. HIPOTEZY BADAWCZE, CEL I ZAKRES PRACY	41
4. MATERIAŁ DOŚWIADCZALNY I METODY BADAŃ	43
4.1. Materiał biologiczny	43
4.2. Materiał badany	43
4.3. Metody badań	44
4.4. Analizy statystyczne	48
5. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ BADAWCZYCH PRZEDSTAWIONYCH DO OCENY	49
5.1. Genetyczna identyfikacja i klasyfikacja wybranych szczepów bakterii z rzędu <i>Enterobacterales</i> wyizolowanych z łańcucha żywnościowego	49
5.2. Określenie profili oporności na wybrane antybiotyki oraz mechanizmów antybiotykooporności pałeczek z rzędu <i>Enterobacterales</i>	51

5.3.	Określenie aktywności wyizolowanych bakteriofagów oraz zakresu bakteryjnych gospodarzy	59
5.4.	Analiza morfologiczna i charakterystyka genomyczna wytypowanych bakteriofagów	63
5.5.	Ocena skuteczności koktajlu bakteriofagowego w poprawie jakości mikrobiologicznej wybranych minimalnie przetworzonych matryc żywnościowych.....	65
6.	STWIERDZENIA I WNIOSKI	69
7.	SPIS LITERATURY.....	71
8.	ANEKS	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
CYKL PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ WRAZ Z OŚWIADCZENIAM I WSPÓŁAUTORÓW.....		Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
	WYKAZ POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH	369

WSTĘP

Obecne w przemyśle spożywczym bakterie patogenne stanowią realne zagrożenie dla bezpieczeństwa zdrowotnego konsumentów. W produkcji żywności o minimalnym stopniu przetworzenia, obok bakteryjnej mikrobioty patogennej, równie istotnym problemem są bakterie saprofityczne, których wzrost i rozwój powodują obniżenie jakości tych produktów. Powszechne w ostatnich latach nadużywanie antybiotyków, m.in. w hodowli zwierząt, doprowadziło do znacznego rozprzestrzenienia bakterii wielolekoopornych, które mogą stanowić jeden z wektorów transmisji antybiotykooporności w przemyśle spożywczym. W związku z tym istnieje pilna potrzeba opracowania naukowych podstaw dla rozwoju innowacyjnych i bezinwazyjnych metod utrwalania żywności ukierunkowanych na eliminację dominującej mikrobioty bakteryjnej. Alternatywą wobec konwencjonalnych metod utrwalania żywności jest wykorzystanie bakteriofagów, które nie wpływają na pogorszenie jakości sensorycznej żywności, a ich zastosowanie może ograniczyć wzrost mikrobioty bakteryjnej w żywności. Ponadto bakteriofagi nie stanowią zagrożenia dla komórek eukariotycznych, a dzięki wysokiej specyficzności nie zaburzają mikrobioty jelitowej człowieka i zwierząt. Pomimo braku dopuszczenia biopreparatów fagowych do komercyjnego stosowania w UE, badania wielu europejskich ośrodków naukowych ukierunkowane są na możliwość potencjalnego wykorzystania tej metody utrwalania żywności.

Głównym powodem podjęcia niniejszego tematu badawczego było określenie skali problemu związanego z transmisją antybiotykooporności wśród szczepów bakteryjnych wyizolowanych z różnych ogniw łańcucha żywnościowego, a następnie izolacja autochtonicznych, wirulentnych bakteriofagów ukierunkowanych na eliminację tych bakterii w matrycach żywnościowych stanowiących minimalne przetworzone produkty roślinne. Opracowanie koktajlu rodzimych, obligatoryjnie litycznych bakteriofagów i ich zastosowanie w formie biopreparatu do ochrony żywności może być skuteczną metodą eradykacji dominującej mikrobioty bakteryjnej najczęściej izolowanej z żywności oferowanej na polskim rynku. Ograniczenie poziomu kontaminacji żywności mikrobiotą bakteryjną, w tym szczepami wielolekoopornymi, może jednocześnie ograniczyć transfer antybiotykooporności w środowisku. W dalszej perspektywie zmniejszy to częstość występowania wśród polskich konsumentów przypadków zatruc pokarmowych spowodowanych spożyciem zanieczyszczonej żywności i/lub może wspomóc leczenie pacjentów wymagających hospitalizacji.

Wykorzystanie potencjału bakteriofagów w przemyśle spożywczym może stanowić obiecującą, całkowicie naturalną i biologiczną metodę zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności i ochrony zdrowia konsumentów.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- Abi** – system abortywnej infekcji (ang. abortive infection system)
- AHL** – lakton N-acylo-L-homoseryny (ang. acyl homoserine lactone)
- AMR** – oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe, antybiotykooporność (ang. antimicrobial resistance)
- AMS** – zarządzanie antybiotykami (ang. antibiotic stewardship)
- ARG** – gen związany z antybiotykoopornością (ang. antibiotic resistance gene)
- BREX** – system wykluczenia bakteriofaga (ang. bacteriophage exclusion)
- BVS** – Podkomisja ds. Wirusów Bakteryjnych (ang. Bacterial Viruses Subcommittee)
- CDC** – Centrum Kontroli i Prewencji Zakażeń (ang. Centers for Disease Control and Prevention)
- CFU** – jednostka tworząca kolonię (ang. colony-forming unit)
- CRISPR** – ciąg zgrupowanych, regularnie rozmieszczonych, krótkich sekwencji palindromicznych (ang. clustered, regularly interspaced short palindromic repeats)
- DDST** – dwukrażkowy test synergii (ang. double-disk synergy test)
- DHF** – dihydrofolian (ang. dihydrofolate)
- DISARM** – system wyspy obronnej związany z restrykcją-modyfikacją (ang. defense island system associated with restriction modification)
- dsDNA** – dwuniciowy kwas deoksyrybonukleinowy (ang. double-stranded deoxyribonucleic acid)
- dsRNA** – dwuniciowy kwas rybonukleinowy (ang. double-stranded ribonucleic acid)
- ECDC** – Europejskie Centrum Prewencji i Kontroli Chorób (ang. European Centre for Disease Prevention and Control)
- EFSA** – Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority)
- EHEC** – enterokrwotoczna *Escherichia coli* (ang. enterohemorrhagic *Escherichia coli*)
- ESBL** – β -laktamaza o rozszerzonym spektrum substratowym (ang. extended-spectrum beta-lactamase)
- EUCAST** – Europejski Komitet ds. Oznaczania Wrażliwości Mikroorganizmów (ang. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
- FDA** – Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration)
- FEEDAP** – Panel ds. Dodatków i Produktów lub Substancji Wykorzystywanych w Paszach dla Zwierząt (ang. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed)
- GEI** – wyspa genomowa (ang. genome island)
- GRAS** – generalnie uznawany za bezpieczny (ang. generally recognized as safe)
- HGT** – horyzontalny transfer genów (ang. horizontal gene transfer)
- HHP** – wysokie ciśnienie hydrostatyczne (ang. high hydrostatic pressure)
- HIV** – ludzki wirus niedoboru odporności (ang. human immunodeficiency virus)

HPUS – ultradźwięki o dużej mocy (ang. high–power ultrasound)

ICTV – Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ang. International Committee on Taxonomy of Viruses)

LAB – bakterie kwasu mlekowego (ang. lactic acid bacteria)

MALDI–TOF MS – spektrometryczna metoda laserowej jonizacji/desorpcji próbki wspomagana matrycą z analizatorem czasu przelotu (ang. matrix–assisted laser desorption/ionization with time–of–flight analyzer mass spectrometry)

MAP – pakowanie w atmosferze modyfikowanej (ang. modified atmosphere packaging)

MAR – wielokrotna oporność na antybiotyki (ang. multiple antibiotic resistance)

MDR – oporność wielolekowa, wielolekooporność (ang. multidrug resistant, multidrug–resistance)

MIC – minimalne stężenie hamujące (ang. minimal inhibitory concentration)

MOI – współczynnik infekcji (ang. multiplicity of infection)

MPF – żywność minimalnie przetworzona (ang. minimally processed food)

MRSA – oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus* (ang. methicillin–resistant *Staphylococcus aureus*)

NCBI – Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej (ang. National Center for Biotechnology Information)

NGS – sekwencjonowanie następnej generacji (ang. next generation sequencing)

PABA – kwas para–aminobenzoowy (ang. *p*–aminobenzoic acid)

PAI – wyspa patogenności (ang. pathogenicity island)

PAM – motyw sąsiadujący z protoprzerywnikiem (ang. protospacer–adjacent motif)

PEF – pulsacyjne pole elektryczne (ang. pulsed electric field)

PFGE – elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (ang. pulsed–field gel electrophoresis)

PFU – jednostka tworząca łyśinkę (ang. plaque–forming unit)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)

Sie – mechanizm wykluczający nadkażenie (ang. superinfection exclusion mechanism)

SPI – wyspa patogenności *Salmonella* (ang. *Salmonella* pathogenicity island)

ssDNA – jednoniciowy kwas deoksyrybonukleinowy (ang. single–stranded deoxyribonucleic acid)

ssRNA – jednoniciowy kwas rybonukleinowy (ang. single–stranded ribonucleic acid)

TEM – transmisyjny mikroskop elektronowy (ang. transmission electron microscopy)

THF – tetrahydrofolian (ang. tetrahydrofolate)

USDA – Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (ang. United States Department of Agriculture)

VISA – *Staphylococcus aureus* średniooporny na wankomycynę (ang. vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*)

VRBG – podłoże z żółcią, czerwienią obojętną, fioletem krystalicznym i glukozą (ang. violet red bile glucose agar)

VRSA – *Staphylococcus aureus* oporny na wankomycynę (ang. vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*)

WGS – sekwencjonowanie całego genomu (ang. whole genome sequencing)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

1. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO PRZEDKŁADANEGO DO OCENY

W skład osiągnięcia naukowego stanowiącego pracę doktorską pt. „Wykorzystanie potencjału bakteriofagów w biokontroli wybranych bakterii z rzędu *Enterobacterales* występujących w łańcuchu żywnościowym” wchodzi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie pięciu artykułów naukowych zgodny z wymaganiami art. 187 ust. 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 ze zm.), przygotowany w trybie eksternistycznym, o którym mowa w art. 197 pkt 2 Ustawy:

[P1] **Wójcicki M., Średnicka P., Błażej S., Gientka I., Kowalczyk M., Emanowicz P., Świder O., Sokołowska B., Juszcuk-Kubiak E.** (2021). Characterization and genome study of novel lytic bacteriophages against prevailing saprophytic bacterial microflora of minimally processed plant-based food products. *International Journal of Molecular Sciences*, DOI:10.3390/ijms222212460 (IF₂₀₂₁ = **6,208; 140 pkt. MEiN**). Liczba cytowań wg bazy Scopus = 3.

Mój udział w realizacji przedstawionej publikacji obejmował: opracowanie koncepcji pracy, głównego celu badań i celów szczegółowych (z pomocą merytoryczną prof. dr. hab. inż. Stanisława Błażejaka, dr hab. inż. Iwony Gientki, prof. SGGW oraz dr hab. Edyty Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB), samodzielne ustalenie zakresu badań, opracowanie i optymalizację metod badawczych niezbędnych do realizacji postawionych celów, wykonanie wszystkich zaplanowanych prac eksperymentalnych z pomocą pozostałych współautorów publikacji wraz z nadzorem nad prawidłowym wykonaniem części doświadczalnych oraz interpretację uzyskanych wyników, przegląd pozycji literaturowych do przygotowania wstępu teoretycznego i omówienia uzyskanych wyników, opracowanie graficzne wszystkich tabel oraz figur (z pomocą mgr Pauliny Średnickiej oraz dr hab. Edyty Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB), przygotowanie tekstu manuskryptu, jego edycję oraz udzielenie odpowiedzi na uwagi recenzentów (z pomocą merytoryczną prof. dr. hab. inż. Stanisława Błażejaka oraz dr hab. Edyty Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB).

[P2] **Wójcicki M., Świder O., Gientka I., Błażej S., Średnicka P., Shymialevich D., Cieślak H., Wardaszka A., Emanowicz P., Sokołowska B., Juszcuk-Kubiak E.** (2023). Effectiveness of a phage cocktail as a potential biocontrol agent against saprophytic bacteria in ready-to-eat plant-based food. *Viruses*, DOI:10.3390/v15010172 (IF₂₀₂₂ = **4,7; 100 pkt. MEiN**). Liczba cytowań wg bazy Scopus = 2.

Mój udział w realizacji przedstawionej publikacji obejmował: opracowanie koncepcji pracy, głównego celu badań i celów szczegółowych (z pomocą

merytoryczną prof. dr. hab. inż. Stanisława Błażejaka), samodzielne ustalenie zakresu badań, opracowanie metodyki dla poszczególnych zadań badawczych (z pomocą merytoryczną dr hab. inż. Iwony Gientki, prof. SGGW oraz prof. dr. hab. inż. Stanisława Błażejaka), wnikliwy przegląd pozycji literaturowych do przygotowania wstępu teoretycznego i omówienia uzyskanych wyników, przeprowadzenie prac eksperymentalnych z pomocą pozostałych współautorów publikacji wraz z nadzorem nad prawidłowym wykonaniem części doświadczalnych, samodzielną analizę uzyskanych wyników doświadczeń oraz graficzne przedstawienie wszystkich tabel, samodzielne przygotowanie tekstu manuskryptu i jego edycję pod względem gramatycznym, stylistycznym, korekty językowej (korekta tekstu manuskryptu z pomocą mgr inż. Olgi Świder) oraz udzielenie odpowiedzi na uwagi recenzentów i korespondencję z redakcją (autor korespondujący).

[P3] Wójcicki M., Świder O., Daniluk K.J., Średnicka P., Akimowicz M., Roszko M.Ł., Sokołowska B., Juszcuk-Kubiak E. (2021). Transcriptional regulation of the multiple resistance mechanisms in *Salmonella* – a review. *Pathogens*, DOI:10.3390/pathogens10070801 (**IF₂₀₂₁ = 4,531; 100 pkt. MEiN**). Liczba cytowań wg bazy Scopus = 11.

Mój udział w realizacji przedstawionej publikacji obejmował: opracowanie koncepcji i celu artykułu przeglądowego, ze zwróceniem szczególnej uwagi na najnowszą wiedzę z zakresu lekooporności patogenów bakteryjnych (z pomocą merytoryczną dr hab. Edyty Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB), ostateczne ustalenie poszczególnych rozdziałów pracy przeglądowej, samodzielny przegląd, nadzór i wybór odpowiednich pozycji literaturowych spośród wyszukanych przez współautorów artykułu, opracowanie graficzne wszystkich figur oraz tabel, przygotowanie tekstu manuskryptu, jego edycję oraz udzielenie odpowiedzi na uwagi recenzentów (przy wsparciu merytorycznym dr hab. Edyty Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB).

[P4] Wójcicki M., Chmielarczyk A., Świder O., Średnicka P., Strus M., Kasperski T., Shymialevich D., Cieślak H., Emanowicz P., Kowalczyk M., Sokołowska B., Juszcuk-Kubiak E. (2022). Bacterial pathogens in the food industry: antibiotic resistance and virulence factors of *Salmonella enterica* strains isolated from food chain links. *Pathogens*, DOI:10.3390/pathogens11111323 (**IF₂₀₂₂ = 3,7; 100 pkt. MEiN**). Liczba cytowań wg bazy Scopus = 2.

Mój udział w realizacji przedstawionej publikacji obejmował: opracowanie koncepcji i metodyki badań (z pomocą merytoryczną dr hab. Agnieszki Chmielarczyk), samodzielne ustalenie zakresu badań i przegląd pozycji literaturowych do przygotowania wstępu teoretycznego i omówienia uzyskanych wyników, przeprowadzenie wszystkich prac eksperymentalnych z pomocą pozostałych współautorów publikacji wraz z nadzorem nad prawidłowym

wykonaniem części doświadczalnych, analizę i interpretację uzyskanych wyników doświadczeń oraz graficzne przedstawienie wszystkich figur i tabel (w tym analiza żeli po PFGE z pomocą dr hab. Agnieszki Chmielarczyk), przygotowanie tekstu manuskryptu i jego edycję (z pomocą i wsparciem merytorycznym dr hab. Agnieszki Chmielarczyk, mgr inż. Olgi Świder, prof. dr hab. Magdaleny Strus, dr hab. inż. Barbary Sokołowskiej, prof. IBPRS–PIB oraz dr hab. Edyty Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS–PIB) oraz udzielenie odpowiedzi na uwagi recenzentów i korespondencję z redakcją (autor korespondujący).

[P5] **Wójcicki M., Świder O., Średnicka P., Shymialevich D., Ilczuk T., Koperski Ł., Cieślak H., Sokołowska B., Juszcuk-Kubiak E. (2023).** Newly isolated virulent salmophages for biocontrol of multidrug-resistant *Salmonella* in ready-to-eat plant-based food. *International Journal of Molecular Sciences*, DOI:10.3390/ijms241210134 (IF₂₀₂₂ = 5,6; 140 pkt. MEiN). Liczba cytowań wg bazy Scopus = 1.

Mój udział w realizacji przedstawionej publikacji obejmował: samodzielne opracowanie koncepcji oryginalnej pracy badawczej, celu głównego i celów szczegółowych, samodzielne ustalenie zakresu badań, opracowanie i optymalizację metodyki dla poszczególnych zadań badawczych, przeprowadzenie prac eksperymentalnych z pomocą pozostałych współautorów publikacji wraz z nadzorem nad prawidłowym wykonaniem poszczególnych części doświadczalnych, wnikliwy przegląd i wybór poszczególnych pozycji literaturowych do przygotowania wstępu teoretycznego i omówienia uzyskanych wyników, analizę uzyskanych wyników doświadczeń (z pomocą dr. n. med. Tomasza Ilczuka oraz mgr Pauliny Średnickiej) oraz ich graficzne przedstawienie (z pomocą dr. n. med. Tomasza Ilczuka w zakresie wizualizacji i wymiarowania bakteriofagów w mikroskopie TEM), samodzielne przygotowanie tekstu manuskryptu i jego edycję pod względem gramatycznym, stylistycznym, korekty językowej (korekta tekstu manuskryptu z pomocą mgr inż. Olgi Świder), wybór czasopisma z listy JCR, udzielenie merytorycznych odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz korespondencję z redakcją (autor korespondujący wspólnie z dr hab. inż. Barbarą Sokołowską, prof. IBPRS–PIB).

Cykl opublikowanych i spójnych tematycznie publikacji stanowiący podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia zawiera pięć publikacji o łącznym współczynniku IF = 24,739 dla roku publikacji oraz 580 pkt. MEiN.

Oświadczenia współautorów o ich współudziale w realizacji badań i w przygotowaniu poszczególnych publikacji naukowych stanowiących rozprawę doktorską i przedłożonych do oceny załączono w **Aneksie**.

2. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

2.1. Żywność o minimalnym stopniu przetworzenia

Niedobór składników odżywczych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu lub ich niewystarczające wchłanianie w stosunku do potrzeb prowadzi do stanu niedożywienia. Niewłaściwa dieta prowadząca do nadwagi i otyłości jest główną przyczyną chorób niezakaźnych i zgonów na całym świecie [1,2]. Obok nawyków żywieniowych na zdrowie konsumentów wpływa również proces przetwarzania żywności [2,3].

Wzrastająca świadomość konsumentów dotycząca wpływu racjonalnego odżywiania zarówno na kondycję zdrowotną, fizyczną, jak i psychiczną, prowadzi do zmiany nawyków żywieniowych [4]. W związku z coraz licznymi dowodami dotyczącymi wpływu spożywania produktów świeżych niskoprotworzonych na łagodzenie wielu chorób zwyrodnieniowych, chorób niedokrwienych serca, nowotworów oraz w związku z ogólnym starzeniem się populacji w ostatnich latach obserwowany jest wzrost popytu na żywność minimalnie przetworzoną (MPF) [5,6]. Termin „minimalne przetwarzanie” produktów spożywczych jest definiowany na różne sposoby, na przykład bardzo ogólnie jako najmniejsza możliwa obróbka dla osiągnięcia zamierzonego celu [6]. Bardziej dokładna definicja, która sytuje minimalne metody przetwarzania w kontekście konwencjonalnych technologii, opisuje je jako techniki, które konserwują żywność, ale także w większym stopniu zachowują jej wartość odżywczą i właściwości sensoryczne, zmniejszając zależność od obróbki termicznej jako głównej techniki konserwującej [4]. Powszechnie przyjęta definicja technologii minimalnego przetwarzania odnosi się do nowoczesnych technik, które zapewniają wystarczającą trwałość żywności, aby umożliwić jej transport i dystrybucję, a jednocześnie spełniają wymagania konsumentów dotyczące wygody, świeżości i wysokiej jakości [7]. W 2009 roku wprowadzono system klasyfikacji przetworzonej żywności – NOVA, który uwzględniając rodzaj, stopień (intensywność) przetworzenia żywności i cel technologiczny tych modyfikacji wyróżnia cztery kategorie żywności: a) żywność nieprzetworzona i minimalnie przetworzona; b) przetworzone dodatki kulinarne; c) żywność przetworzona oraz d) żywność wysokoprotworzona [8]. System NOVA przedstawia zupełnie odmienną definicję żywności minimalnie przetworzonej. Według klasyfikacji NOVA żywność minimalnie przetworzona to żywność naturalna (nieprzetworzona) utrwalona metodami, które obejmują usuwanie niejadalnych lub niepożądanych części, a także zmieniona w procesach technologicznych takich jak: suszenie, kruszenie, mielenie, porcjowanie, filtrowanie, prażenie, gotowanie, fermentacja bezalkoholowa, pasteryzacja, schładzanie, zamrażanie, umieszczanie w pojemnikach, pakowanie próżniowe oraz innymi metodami, w których nie występuje dodatek soli, cukru, olejów lub tłuszczów ani innych substancji spożywczych do żywności. Pomiedzy jakością żywności naturalnej a minimalnie

przetworzonej nie ma znaczących różnic, a metody minimalnego przetwarzania mają na celu konserwację naturalnej żywności, co ułatwia przechowywanie i zapewnia jej bezpieczeństwo. Duża część żywności zaliczanej do pierwszej grupy w klasyfikacji NOVA to żywność przygotowana lub gotowana jako potrawy kuchni domowej, a wszystkie produkty z tej grupy, w odpowiednim połączeniu i z zachowaniem różnorodności, stanowią podstawę zdrowej diety [9,10]. Pomimo różnic w interpretacji samego pojęcia „żywności minimalnie przetworzonej” można wyróżnić wspólne cechy charakteryzujące tę grupę produktów: a) dzięki wykorzystaniu łagodnych metod obróbki termicznej i utrwalania zachowują cechy świeżości surowców, z których powstają, w tym turgor, barwę, smak i zapach; b) zachowują wrażliwe w procesie produkcyjnym składniki odżywcze, głównie witaminy, prowitaminy, fitoskładniki i składniki mineralne; c) wykorzystują metody kombinowane, w których łagodnym technikom przetwarzania i utrwalania żywności towarzyszą metody fizykochemiczne lub biologiczne; d) w procesie pakowania żywności wykorzystują warunki modyfikowane i opakowania specjalne dobrane indywidualnie do produktu oraz e) zapewniają warunki chłodnicze w całym łańcuchu produkcji i dystrybucji tego typu żywności [11,12].

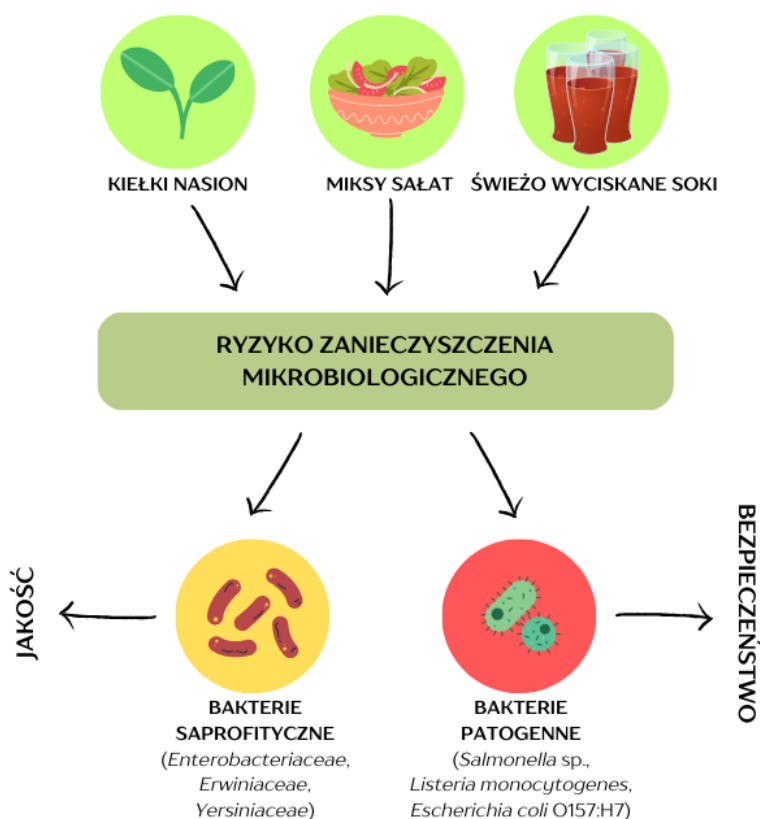
2.1.1. Zagrożenia mikrobiologiczne w minimalnie przetworzonych produktach roślinnych

Zainteresowanie i wzmożony popyt na żywność świeżą, naturalną obserwowany jest od wielu lat. Obecnie konsumenci poszukują produktów niskoprzetworzonych o wysokiej wartości odżywczej, korzystnej dla zdrowia z zachowaniem walorów organoleptycznych [13]. Wyprodukowanie bezpiecznej, minimalnie przetworzonej żywności o pożądanej jakości i przydatności do spożycia wymaga opracowania i/lub udoskonalenia przez sektor spożywczy innowacyjnych, niekonwencjonalnych, nietermicznych metod jej przetwarzania [14,15].

Należy podkreślić, że w technologii minimalnego przetwarzania wykorzystuje się szereg operacji mechanicznych, tj. cięcie czy obieranie, które powodują powstawanie urazów i uwalnianie w miejscu zranienia zawartości komórek [16]. Cięcie produktów minimalnie przetworzonych, tj. owoców i warzyw, może zwiększać ich podatność na infekcje bakteryjne i brązowienie enzymatyczne, zwłaszcza przy wyższych aktywnościach metabolicznych [17]. Podczas obróbki mechanicznej z tkanek roślinnych uwalniane są substancje, które w matrycy produktu mogą propagować wzrost niepożądanych mikroorganizmów. Na przykład wydzielany na powierzchni cięcia sałaty lateks może stymulować wzrost i rozwój enterokrwotocznych pałeczek *Escherichia coli* O157:H7 wytwarzających werotoksynę (EHEC) [18].

Ponadto wyciek soków komórkowych podczas operacji technologicznych powoduje wzrost aktywności wody, co stanowi korzystne warunki do wzrostu

i rozwoju niepożądanych mikroorganizmów w matrycy produktu [19]. W żywności minimalnie przetworzonej pochodzenia roślinnego najwyższe ryzyko mikrobiologiczne dotyczy kiełków nasion, sałat i świeżo wyciskanych soków (**Rysunek 1**). Wysoki poziom kontaminacji tych produktów przez drobnoustroje związany jest z wysokim poziomem obecności mikroorganizmów w surowcach, z których powstają. W przypadku żywności minimalnie przetworzonej pochodzenia roślinnego, obok ryzyka wystąpienia i konieczności monitorowania bakterii patogennych, które decydują o bezpieczeństwie zdrowotnym konsumentów, równie ważną kwestią jest występowanie bakterii saprofitycznych, których intensywny wzrost i rozwój staje się przyczyną obniżenia jakości produktu i skrócenia terminu przydatności do spożycia [20,21].



Rysunek 1. Zagrożenia mikrobiologiczne w żywności minimalnie przetworzonej pochodzenia roślinnego (opracowanie własne). Schemat przygotowany w programie Canva.

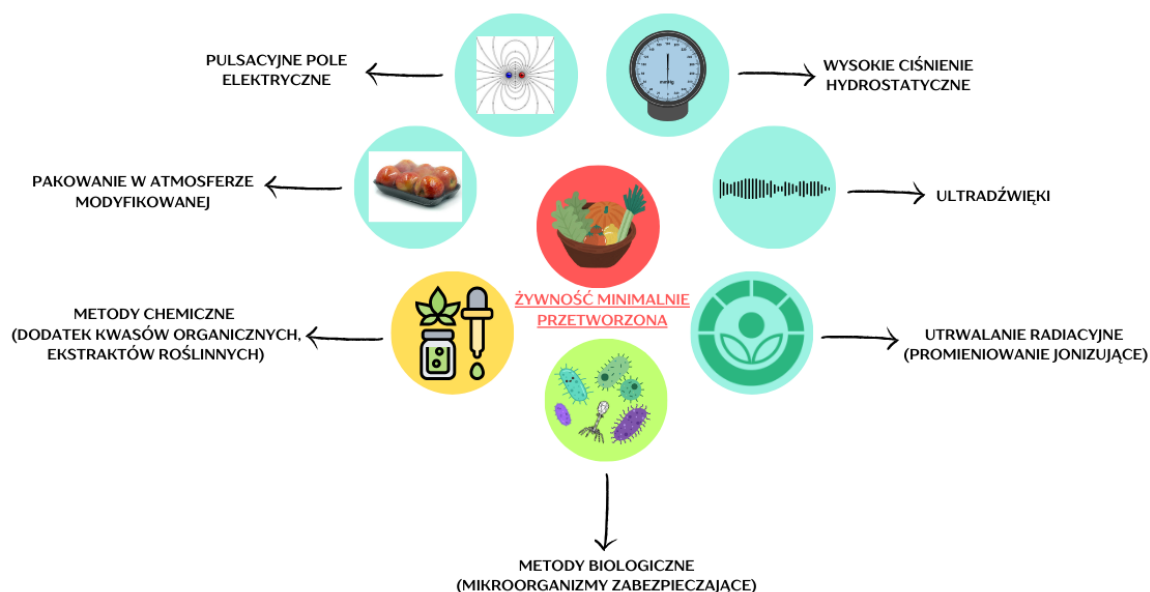
Mikrobiota odpowiedzialna za psucie produktów roślinnych obejmuje przede wszystkim liczne gatunki grzybów i bakterii. Wśród bakterii Gram–ujemnych dominują bakterie z rzędów *Enterobacterales* (głównie rodziny *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* i *Yersiniaceae*) oraz *Pseudomonadales* (rodzina *Pseudomonadaceae*), natomiast wśród bakterii Gram–dodatnich przeważają bakterie kwasu mlekowego (LAB) [22].

Według Rozporządzenia (WE) 2073/2005 (z dnia 15.11.2005 r. z późniejszymi zmianami) w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych, produkt spożywczy dopuszczony do obrotu handlowego nie może zawierać w 25 g (lub 25 ml) pałeczek *Salmonella*. W przypadku warzyw, owoców

i produktów pochodnych europejskie ustawodawstwo normuje jedynie poziom Gram–ujemnych pałeczek z gatunku *Escherichia coli* w owocach i warzywach krojonych (gotowych do spożycia) oraz w niepasteryzowanych sokach owocowych i warzywnych (gotowych do spożycia), a wymagania te dotyczą jakości mikrobiologicznej procesu produkcyjnego [23]. Biorąc pod uwagę normy innych krajów UE (np. Francji czy Niemiec), dopuszczalny poziom liczby drobnoustrojów mezofilnych wynosi $5,0 \times 10^7$ CFU ml⁻¹ [24].

2.1.2. Metody utrwalania żywności minimalnie przetworzonej

W celu zapewnienia bezpieczeństwa i wysokiej jakości żywności o minimalnym stopniu przetworzenia sektor spożywczy opracowuje i wdraża szereg metod utrwalania produktów tego typu. Powszechnie stosowane w utrwalaniu żywności minimalnie przetworzonej są obróbka nietermiczna, przechowywanie w temperaturach chłodniczych, zastosowanie nowych technik pakowania, wykorzystanie naturalnych środków przeciwdrobnoustrojowych czy technologii „płotków” (in. przeszkód, ang. *hurdle technology*) [4,11]. Na **Rysunku 2.** przedstawiono główne fizyczne, chemiczne i biologiczne metody wykorzystywane w utrwalaniu produktów minimalnie przetworzonych.



Rysunek 2. Metody utrwalania żywności minimalnie przetworzonej (opracowanie własne). Schemat przygotowany w programie Canva.

Spośród metod fizycznych, do utrwalania żywności o minimalnym stopniu przetworzenia stosuje się promieniowanie jonizujące, ultradźwięki, technologie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego i pulsacyjne pole elektryczne.

Promieniowanie jonizujące (radiacja) jest uważane za jedną z najlepszych metod redukcji mikroorganizmów w żywności przy jednoczesnym zachowaniu jej wartości odżywczej i jakości sensorycznej [11,25]. Radiacja w UE jest wykorzystywana we Francji, Holandii i Belgii do utrwalania owoców i warzyw,

zbóż, produktów mięsnych i skorupiaków, zaś w Polsce do utrwalania suszonych warzyw, grzybów i przypraw [26]. Zgodnie z zaleceniami sumaryczna emitowana dawka promieniowania do utrwalania żywności metodą radiacyjną nie powinna przekraczać 10 kGy [26,27]. Generowane w wyniku radiacji wolne rodniki mogą wywoływać w warzywach reakcje stresowe, co prowadzi do zwiększonej syntezy związków przeciwutleniających [28]. Depolimeryzacja składników ściany komórkowej, takich jak pektyny, celulozy i hemicelulozy, wywołana promieniowaniem γ , może powodować zmniejszenie jędrności i zmiękczenie tkanek roślinnych [29].

Inną metodą utrwalania żywności minimalnie przetworzonej jest wykorzystanie ultradźwięków (sonikacji ultradźwiękowej), czyli fal akustycznych o częstotliwości powyżej 20 kHz [30,31]. Ultradźwięki wykorzystywane są do rozdrabniania cząstek fazy rozproszonej emulsji i zawiesin, m.in. w przemyśle mleczarskim [32]. W procesach przetwarzania i utrwalania żywności, w celu wywołania efektu kawitacji, wykorzystuje się fale ultradźwiękowe o wysokiej mocy (HPUS) i małej częstotliwości (od 20 do 100 kHz). Kawitacja wpływa na fizykochemiczne i biochemiczne właściwości produktów, szczególnie na dezintegrację struktur komórkowych [33,34]. Przerwanie ciągłości ścian komórkowych i błon cytoplazmatycznych przyczynia się do inaktywacji mikroorganizmów i jednocześnie może powodować uwalnianie zawartości komórek roślinnych do środowiska, dlatego technika ta nie jest zalecana do utrwalania żywności pochodzenia roślinnego [11].

W technologii wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) wykorzystuje się podwyższone ciśnienie (do 600 MPa) z dodatkiem lub bez dodatku ciepła zewnętrznego, co gwarantuje inaktywację drobnoustrojów wegetatywnych i/lub zmianę właściwości fizycznych żywności bez wpływu na związki smakowe i witaminy [35]. Obróbka wysokociśnieniowa, zwana też paskalizacją, zaburza integralność błon cytoplazmatycznych drobnoustrojów oraz wywołuje zmiany wewnątrzkomórkowe, w tym uszkodzenia materiału genetycznego [36]. Oporność drobnoustrojów na HHP różni się w zależności od zakresu stosowanego ciśnienia, temperatury, czasu obróbki i rodzaju drobnoustrojów [4,37]. Wyjątkowo odporne na HHP są przetrwalniki bakterii, które można zniszczyć tylko w fazie kiełkowania. Przetrwalniki bakterii i wirusy można inaktywować stosując bardzo wysokie ciśnienie (ponad 1000 MPa) lub równoczesne ogrzewanie [38]. HHP można wykorzystać również do restrukturyzacji białek żywności, gdyż powoduje denaturację, agregację lub żelowanie białek [39].

Kolejną fizyczną metodą utrwalania żywności minimalnie przetworzonej jest pulsacyjne pole elektryczne (PEF). Podczas utrwalania metodą PEF produkty spożywcze umieszczone pomiędzy dwiema elektrodami są poddawane działaniu pola elektrycznego o wysokim napięciu, w zakresie 20–70 kV/cm przez kilka mikrosekund [40]. W ten sposób nie dochodzi do ogrzania żywności, ale następują lokalne zmiany struktury i degradacja błon komórkowych [11]. PEF jest lepszą technologią niż tradycyjna obróbka termiczna żywności, ponieważ gwarantuje

zachowanie cech sensorycznych i fizycznych produktów oraz wyższą zawartość składników odżywczych i fitozwiązków przy jednoczesnej inaktywacji zanieczyszczeń biologicznych [40,41]. Stres spowodowany chwilowymi zmianami w momencie osiągnięcia potencjału membranowego może prowadzić do utraty turgoru tkanek i zwiększenia możliwości ekstrakcji z komórek wartościowych składników, co ogranicza zastosowanie tej techniki do utrwalania produktów świeżych pochodzenia roślinnego [42].

Jednym z podstawowych systemów zabezpieczających żywność przed działaniem czynników zewnętrznych jest pakowanie w atmosferze modyfikowanej (MAP). Podstawową koncepcją MAP jest zastąpienie powietrza w przestrzeni opakowania określonym gazem lub mieszaniną gazów [4,28]. MAP stał się szeroko stosowaną techniką konserwacji żywności, zwłaszcza świeżo pokrojonych owoców i warzyw, celem wydłużenia okresu przydatności do spożycia w wyniku zmniejszenia utraty wody, zahamowania brązowienia powierzchni krojenia, obniżenia tempa oddychania i biosyntezy etylenu przez niski poziom tlenu i wysoki poziom dwutlenku węgla, opóźnienia zmiękczenia tkanek i opóźnienia wzrostu drobnoustrojów [28]. W ostatnich latach do technologii MAP wprowadzono elementy funkcjonalne (tzw. pakowanie interaktywne), takie jak opakowania aktywne i inteligentne, które pomagają rozwiązywać problemy związane z bezpieczeństwem żywności [43].

Inną metodą zapewnienia bezpieczeństwa żywności jest zastosowanie powłok jadalnych, które zapewniają półprzepuszczalną barierę gazową chroniącą przed tlenem, dwutlenkiem węgla i wilgocią między żywnością a otaczającą atmosferą oraz zmniejszają oddychanie, utratę wody, migrację substancji rozpuszczonych, szybkość reakcji utleniania w świeżych produktach, a także minimalizują zanieczyszczenie mikrobiologiczne [4,44]. Powłoki mogą być również nośnikami dodatków do żywności, takich jak środki zapobiegające brązowieniu, związki przeciwdrobnoustrojowe, składniki odżywcze, barwniki, aromaty i przyprawy celem poprawy jakości i bezpieczeństwa oraz wydłużenia okresu przydatności do spożycia produktów minimalnie przetworzonych [4].

Chemiczne metody utrwalania świeżo krojonych owoców i warzyw obejmują głównie obróbkę powierzchni poprzez zanurzenie produktów w roztworach zawierających środki przeciwdrobnoustrojowe, przeciwutleniacze, sole wapnia lub składniki funkcjonalne, co wpływa na poprawę jakości i wydłużenie terminu przydatności do spożycia [4,45]. Zabiegi zanurzania w kwasach organicznych stosuje się najczęściej celem ograniczenia reakcji brązowienia, utrzymania jędrności i poprawy jakości sensorycznej [4,46]. Coraz większą uwagę zwraca się na wykorzystanie naturalnych olejków eterycznych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym [46]. Do odkażania świeżych i minimalnie przetworzonych owoców i warzyw stosowane są także środki na bazie chloru. Kontrowersje związane z wykorzystaniem związków chloru wynikają z tworzenia kancerogennych związków organicznych [47]. Innym związkiem wykorzystywanym do utrwalania żywności jest ozon, z uwagi na

niepozostawianie niebezpiecznych pozostałości w żywności, jest potencjalną alternatywą dla chloru celem sanityzacji świeżych produktów [48]. Z kolei nadtlenek wodoru posiada silne właściwości utleniające i zdolność do generowania szeregu toksycznych dla żywych komórek utleniaczy – reaktywnych form tlenu (ROS), takich jak rodniki hydroksylowe czy singletowe formy tlenu [49]. Jednak dla niektórych świeżych i minimalnie przetworzonych produktów nadtlenek wodoru może być fitotoksyczny, powodując intensywne brązowienie lub bielenie [50].

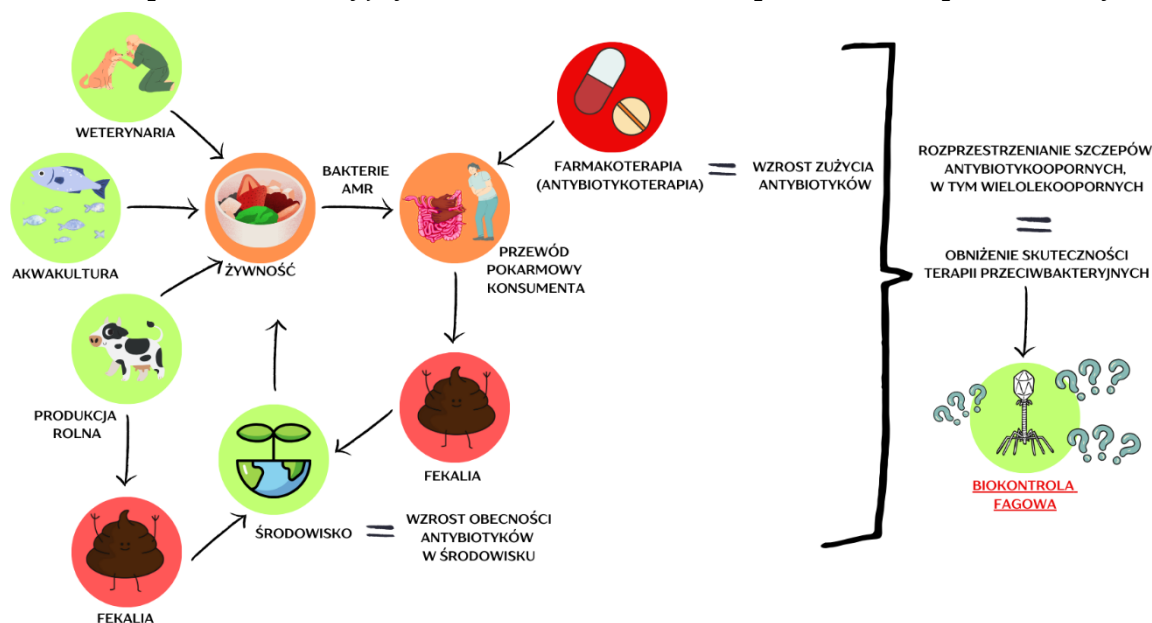
W ostatnich latach panuje tendencja do ograniczenia fizycznych i chemicznych technik utrwalania żywności na rzecz metod biologicznych. Do najbardziej obiecujących środków biokontroli poprawiających trwałość świeżo krojonych owoców i warzyw należą bakterie kwasu mlekowego [13,51]. LAB, podobnie jak niektóre inne bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne, są zdolne do produkcji bakteriocyn, czyli substancji o strukturze białkowej i działaniu bakteriobójczym lub bakteriostatycznym [52]. Inną biologiczną metodą utrwalania żywności jest zastosowanie swoistych, ściśle litycznych bakteriofagów. Metodę biokonserwacji żywności z wykorzystaniem biopreparatów bakteriofagowych omówiono w **podrozdziale 2.3**.

Przechowywanie w modyfikowanej atmosferze czy warunkach chłodniczych, ze względu na nadmierny stres fizjologiczny, zazwyczaj nie gwarantuje wystarczającego przedłużenia okresu przydatności do spożycia świeżych produktów krojonych. Operacje technologiczne, takie jak cięcie i krojenie, wpływają na zmiany mikrobiologiczne i znacznie skracają okres przydatności do spożycia. W związku z powyższym przemysł spożywczy wprowadził technologie przeszkód, które polegają na połączeniu kilku różnych technik konserwacji celem ograniczenia intensywnego stosowania jednej metody utrwalania, co skutkuje mniejszym wpływem na jakość sensoryczną i w konsekwencji przedłużeniem okresu przydatności do spożycia [53].

2.2. Żywność jako wektor bakterii antybiotykoopornych

Nieracjonalne zarządzanie polityką antybiotykową (AMS) doprowadziło do sytuacji, kiedy od początku XXI wieku mamy do czynienia z erą postantybiotykową [54,55]. Antybiotyki coraz częściej są nieskuteczne w leczeniu infekcji bakteryjnych. Nabywanie przez bakterie oporności na antybiotyki związane jest z obecnością w środowisku genów oporności (ARGs) [56]. Szybkie rozprzestrzenianie ARGs w znacznym stopniu związane jest z nadużywaniem antybiotyków przez plantatorów roślin i hodowców zwierząt, a wiele badań wskazuje żywność jako znaczący rezerwuar ARGs [56,57] (**Rysunek 3**). Przykładem może być powszechne w latach 50. stosowanie streptomycyny w sadownictwie celem ograniczenia zakażeń jabłoni i gruszy przez bakterie z gatunku *Erwinia amylovora*. W niektórych krajach spoza UE (tj. Izraelu, Kanadzie,

Meksyku, Nowej Zelandii) antybiotyk ten wciąż jest dopuszczony w rolnictwie środkiem przeciwbakteryjnym [57]. Ponadto w USA prawie 80% sprzedawanych



Rysunek 3. Problem występowania bakterii antybioopornych w łańcuchu żywnościowym (opracowanie własne). Schemat przygotowany w programie Canva.

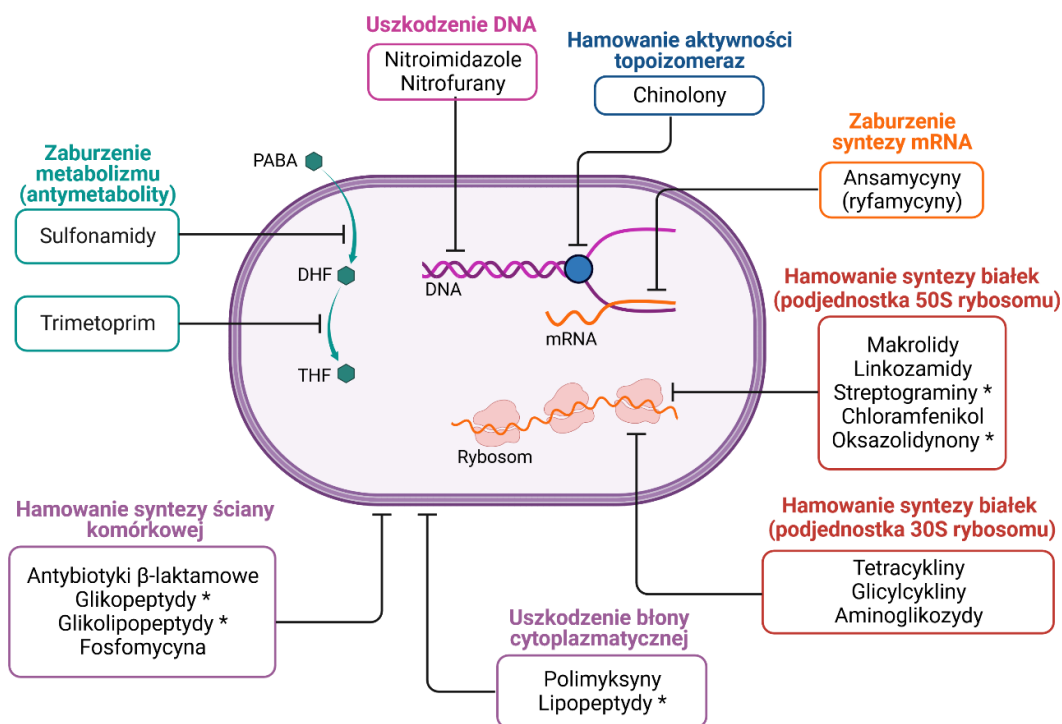
antybiotyków wykorzystywanych jest w rolnictwie [58]. Pola uprawne nawożone nawozem naturalnym (tj. obornikiem czy gnojowicą) stanowią źródło rozprzestrzeniania ARGs oraz ich transferu zarówno do bakterii glebowych, jak i tych bytujących w środowisku wodnym [59]. W dalszych etapach determinanty oporności mogą trafić do organizmów ludzi i zwierząt. W wyniku powyższych zależności geny warunkujące oporność na antybiotyki są identyfikowane w produktach spożywczych. ARGs wykryto w produktach mięsnych oraz żywności minimalnie przetworzonej pochodzenia roślinnego tj. owocach i warzywach. Geny warunkujące oporność na antybiotyki rozprzestrzeniły się w środowisku również w wyniku intensywnej działalności przemysłu mleczarskiego [57,60]. Zatrucia pokarmowe spowodowane spożyciem skażonych mikrobiologicznie żywności i wody pitnej wymagają wdrożenia farmakoterapii. Niepokojące jest, że prawie 90% antybiotyków przepisywanych pacjentom jest nieuzasadniona, co prowadzi do rozprzestrzeniania szczepów antybioopornych (AMR), w tym wielolekoopornych (MDR), oraz ARGs [61].

Obecnie bakteryjna wielolekooporność to problem światowy. Celem ochrony i racjonalnego gospodarowania antybiotykami wprowadzono regulacje prawne dotyczące ich stosowania. Od 2006 roku UE zakazała wykorzystania antybiotyków jako stymulatorów wzrostu w produkcji zwierzęcej [62,63]. Problem lekooporności stał się przedmiotem działań Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej. W Programie Wspólnoty w zakresie zdrowia publicznego lekooporność, obok gruźlicy, zakażeń wirusami HIV i grypy, jest jednym z czterech priorytetowych

zagadnień [64]. Wszystkie kraje członkowskie UE zobowiązano do opracowania narodowych programów działań we wspomnianych czterech obszarach priorytetowych. W Polsce od wielu lat funkcjonuje Narodowy Program Ochrony Antybiotyków, którego działania koordynowane były przez Zespół Pionu Mikrobiologii Klinicznej i Profilaktyki Zakazań w Narodowym Instytucie Leków (uprzednio Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego). Od 2021 roku wybrane zadania Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków realizowane są w ramach Narodowego Programu Zdrowia na lata 2021–2025 [65].

2.2.1. Antybiotyki i mechanizm ich działania

Leki przeciwbakteryjne to zróżnicowana grupa związków. Do antybiotyków należą wszystkie leki przeciwbakteryjne zarówno pochodzenia naturalnego, jak i syntetyczne chemioterapeutyki [66]. Istnieje kilka sposobów klasyfikacji antybiotyków, które uwzględniają: a) budowę chemiczną (strukturę molekularną); b) sposób działania (tj. leki bakteriobójcze i bakteriostatyczne); c) mechanizm działania; d) spektrum (zakres) aktywności oraz e) drogę podania (tj. dożylnie, doustnie lub miejscowo) [67,68]. Antybiotyki o zbliżonej strukturze molekularnej wykazują podobny wzór skuteczności, toksyczności i potencjalne skutki uboczne [67,69]. Na **Rysunku 4.** przedstawiono mechanizmy działania wybranych antybiotyków na komórkę bakteryjną.



Rysunek 4. Mechanizm działania wybranych grup leków (opracowanie własne). Schemat przygotowano w programie BioRender (nr licencji: SB25UABZLD). Oznaczenia na rysunku: PABA – kwas para-aminobenzoowy; DHF – dihydrofolian; THF – tetrahydrofolian. Gwiazdką (*) oznaczono antybiotyki wykazujące aktywność wyłącznie wobec bakterii Gram-dodatnich.

2.2.2. Antybiotykooporność i mechanizmy oporności pałeczek z rzędu *Enterobacterales*

Wprowadzanie do leczenia zakażeń bakteryjnych nowych antybiotyków przyczyniło się do wyselekcjonowania mutantów lekoopornych. Oporność nabyta jest konsekwencją zmian w genomie bakterii, które mogą dotyczyć losowych mutacji w wyniku błędów popełnianych przez polimerazy DNA lub być indukowane przez elementy transpozycyjne. Nabywanie oporności może być również wynikiem horyzontalnego transferu genów (HGT), gdzie podczas koniugacji, transformacji i transdukcji bakterie przekazują między sobą pojedyncze geny lub zespoły genów determinujących oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe. W procesie nabywania oporności ważną rolę odgrywają również: a) ruchome elementy genetyczne, w tym plazmidy, bakteriofagi i kasety opornościowe integronów; b) rekombinacja homologiczna, rekombinacja zlokalizowana i transpozycja oraz c) presja selekcyjna [66]. Definicje oporności nabytej na antybiotyki opracowali eksperci wybrani przez Europejskie Centrum Prewencji i Kontroli Chorób (ECDC) w Sztokholmie oraz amerykańskie Centrum Kontroli i Prewencji Zakażeń (CDC):

- MDR – wielolekooporność (ang. *multidrug-resistance*) → szczep jest niewrażliwy na co najmniej jeden antybiotyk z trzech lub więcej grup leków przeciwbakteryjnych;
- XDR – rozszerzona oporność (ang. *extensively drug resistance*) → szczep jest niewrażliwy na co najmniej jeden antybiotyk ze wszystkich z wyjątkiem co najwyżej dwóch grup antybiotyków stosowanych w terapii zakażeń wywoływanych przez dany drobnoustrój;
- PDR – całkowita oporność (ang. *pandrug-resistance*) → szczep jest niewrażliwy na wszystkie dostępne, zarejestrowane antybiotyki ze wszystkich kategorii, stosowane wobec danego gatunku drobnoustroju [70–72].

Bakterie w toku ewolucji wykształciły szereg mechanizmów oporności na antybiotyki, do których należą: a) zmiany w miejscu docelowym działania leku, przez co chemioterapeutyk nie może z nim oddziaływać; b) zmniejszenie przepuszczalności osłon komórkowych, co hamuje transport leku do wnętrza komórki; c) wytwarzanie enzymów modyfikujących chemicznie cząsteczki leków, co prowadzi do utraty ich aktywności; d) mechanizm aktywnego usuwania leku z komórki przez pompy wypływu leków (ang. *efflux pump*), co zmniejsza jego stężenie w komórce; e) wytworzenie alternatywnej drogi lub produkcja alternatywnego enzymu, które omijają etap wrażliwy na lek oraz f) synteza białek ochronnych dla struktur komórkowych lub enzymów będących celem dla działania leków [66,73,74].

Molekularne mechanizmy antybiotykooporności wykształcone przez pałeczki z rodzaju *Salmonella* omówiono szczegółowo w publikacji [P3].

2.2.3. Naturalna oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe pałeczek z rzędu *Enterobacterales*

Oprócz oporności nabytej bakterie cechuje oporność naturalna, która występuje powszechnie w obrębie danej rodziny, rodzaju czy gatunku bakterii. Jest ona niezależna od wcześniejszej ekspozycji na antybiotyki i nie wiąże się z HGT. Oporność naturalna wynika z: a) braku w komórce bakteryjnej miejsca docelowego dla leku; b) obecności struktur uniemożliwiających dotarcie leku do celu (np. lipopolisacharydy w ścianie komórkowej bakterii Gram-ujemnych) lub c) funkcjonowania konkretnych mechanizmów oporności, których efekторы (np. enzymy czy transportery błonowe) kodowane są przez charakterystyczne dla danego gatunku bakterii geny chromosomowe (Tabela 1.) [73,75].

Tabela 1. Naturalna oporność wybranych Gram-ujemnych bakterii z rzędu *Enterobacterales* na leki przeciwbakteryjne (opracowano na podstawie [66,76]).

Bakterie	Oporność naturalna
rzęd <i>Enterobacterales</i>	glikopeptydy, lipopeptydy
<i>Escherichia coli</i> , <i>Serratia marcescens</i>	makrolidy
<i>Klebsiella</i> spp., <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Escherichia hermannii</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus penneri</i> , <i>Providencia</i> spp., <i>Serratia marcescens</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>	aminopenicyliny (ampicylina, amoksycylina)
<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Providencia</i> spp., <i>Serratia marcescens</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>	amoksycylina/kwas klawulanowy

2.3. Bakteriofagi jako naturalna metoda biokontroli mikrobioty bakteryjnej w żywności

Nasilające się rozprzestrzenianie szczepów wielolekoopornych i zakażenia wywoływane przez bakterie MDR stanowią obecnie poważny problem zdrowia publicznego. Dlatego też istnieje pilna potrzeba opracowania alternatywnych dla antybiotykoterapii efektywnych środków przeciwbakteryjnych [77]. W ostatnich latach zwraca się uwagę na możliwość wykorzystania bakteriofagów jako naturalnych wrogów bakterii. Należy zaznaczyć, że wykorzystanie bakteriofagów nie jest nową metodą zwalczania bakterii, ponieważ terapia fagowa była wykorzystywana w leczeniu zakażeń wywołanych przez szczepy bakteryjne jeszcze przed odkryciem pierwszych antybiotyków [78,79]. W Polsce eksperymentalna, celowana terapia fagowa prowadzona jest przez Ośrodek Terapii Fagowej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu [80–82].

Wzrost zainteresowania konsumentów żywnością minimalnie przetworzoną, w przypadku której zachowanie struktury i wartości odżywczej są kluczowe, powoduje, że przemysł spożywczy poszukuje nowych, w tym biologicznych metod jej utrwalania [83]. Liczne badania wskazują, że bakteriofagi mogą stanowić obiecującą strategię w zapewnieniu bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności, w tym o minimalnym stopniu przetworzenia [84,85]. Zakładając, że bakteriofagi jako bezwzględne patogeny bakterii towarzyszą mikrobiocie żywności, można je wykorzystać jako naturalne czynniki abiotyczne w stosunku do ich gospodarzy [86,87]. Jednak aby mogły być zastosowane w formie biopreparatów do kontroli żywności muszą spełniać rygorystyczne wymagania, zwłaszcza związane z zapewnieniem bezpieczeństwa dla konsumentów.

2.3.1. Klasyfikacja bakteriofagów

Konwencjonalne podejście do klasyfikacji wirusów opiera się na charakterystyce morfologii wirionów z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) oraz strategiach opartych na analizie sekwencji genomu (w tym WGS) [88,89]. Klasyfikację taksonomiczną wirusów, w tym bakteriofagów, opracowuje Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ICTV) [88,90]. Brakuje w pełni uniwersalnych kryteriów, w oparciu o które można określić rodzaj czy gatunek poszczególnych wirusów. Podczas klasyfikacji taksonomicznej, ICTV kieruje się każdą dostępną właściwością fagów zgodnie z koncepcją gatunku politetycznego, zdefiniowanego przez szereg wspólnych właściwości, z których niektóre mogą nie występować u poszczególnych przedstawicieli danego gatunku [91]. Zgodnie z wytycznymi ICTV, podrodziny są tworzone tylko wtedy, gdy dodają niezbędnych informacji hierarchicznych [92]. Rodzaj opisywany jest jako spójna grupa wirusów o wysokim (>70%) stopniu podobieństwa sekwencji nukleotydów. Gatunek, czyli monofiletyczna grupa, której właściwości można odróżnić od innych gatunków za pomocą wielu kryteriów, jest najniższym poziomem taksonomicznym zatwierdzonym przez ICTV [93].

Głównym kryterium demarkacyjnym rozgraniczenia poszczególnych gatunków bakteriofagów jest podobieństwo sekwencji genomu wynoszące przynajmniej 95%, co oznacza, że dwa wirusy należące do tego samego gatunku różnią się od siebie nie więcej niż o 5% na poziomie dopasowania sekwencji nukleotydów [82]. W 2020 r. ICTV głosował za wprowadzeniem binominalnego formatu nazewnictwa gatunków wirusów, w którym nazwa rodzaju i epitet gatunkowy tworzą razem unikalną nazwę gatunku [94]. Podkomisja ds. Wirusów Bakteryjnych (BVS) zdecydowała wdrożyć w pełni dowolny format nazewnictwa binominalnego, w którym grupy badawcze i autorzy propozycji taksonomii są odpowiedzialni za ostateczny format nazw gatunków [95]. Klasyfikacja bakteriofagów na podstawie danych eksperymentalnych jest czasochłonna i pracochłonna, dlatego uczenie maszynowe (ang. *machine learning*) jest jedną

z pomocnych alternatyw [96]. Do nowych narzędzi, które wspierają klasyfikację bakteriofagów należą m.in. aplikacje INPHARED, GRAViTy, vConTact2, virClust, PhaGCN2 oraz PhageAI [97–101].

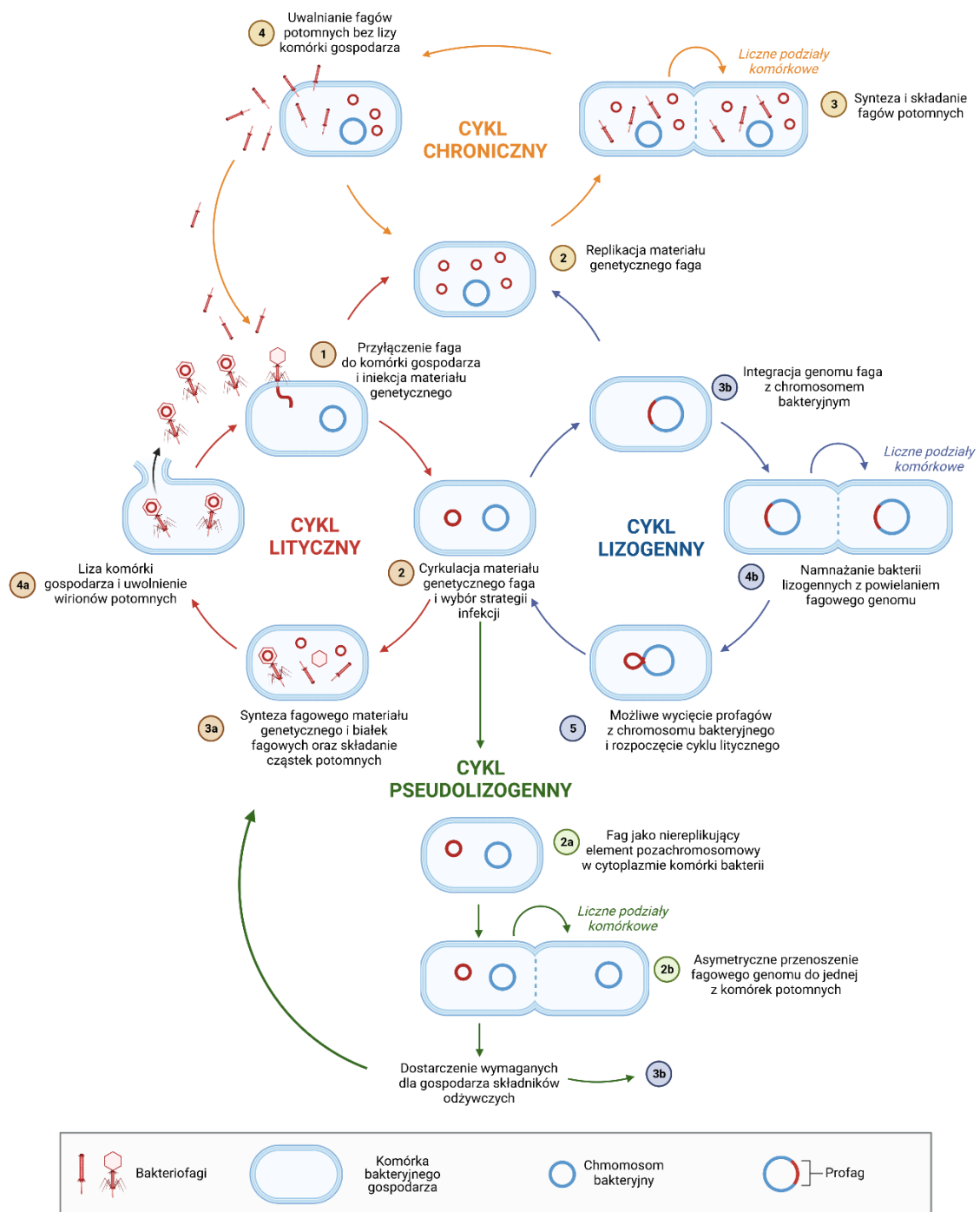
Obecnie najszerzej scharakteryzowaną grupą bakteriofagów są fagi o budowie złożonej należące do klasy *Caudoviricetes*, zawierające ikozaedralną główkę połączoną za pomocą białka łącznikowego formującego kołnierzyk z helikalnym ogonkiem [102]. Klasa *Caudoviricetes* została wyodrębniona przez BVS w 2022 roku. BVS usunęła wówczas rodziny *Myoviridae*, *Podoviridae* i *Siphoviridae*, rząd *Caudovirales* oraz ustaliła binominalny system nazewnictwa gatunków [95]. Obecnie do klasy *Caudoviricetes* należy 7 rzędów, 63 rodziny, 109 podrodzin, 1360 rodzajów i 4079 gatunków wirusów bakteryjnych i archeonów (wg danych na dzień 28.09.2023 r.) [103].

2.3.2. Cykle infekcji fagowych

Warunki środowiska, a także cechy fizjologiczne i genetyczne bakteryjnych gospodarzy mogą powodować różne ścieżki infekcji fagowej [104]. Strategie infekcji fagowych można postrzegać jako kontinuum, które rozciąga się od skutecznych infekcji produktywnych (prowadzących do uwalniania wirionów potomnych) do trwałych infekcji nieproduktywnych, które nie wytwarzają nowych cząstek fagów, ale rozprzestrzeniają genomy profagów w populacji bakterii (w wyniku transmisji z komórki macierzystej do komórki potomnej) [105]. Najlepiej opisane i zrozumiałe drogi namnażania fagów to cykl lityczny i lizogeny [89]. Odmianą cyklu lizogenego jest stan nosicielstwa, czyli cykl pseudolizogeny [106]. Inną formą interakcji fag–gospodarz jest infekcja chroniczna (przewlekła) [105]. Na **Rysunku 5**. przedstawiono graficznie różnice pomiędzy poszczególnymi strategiami infekcji fagowych.

Fagi wirulentne (zjadliwe) charakteryzuje lityczna strategia infekcji. W cyklu litycznym bakteriofag przejmuje kontrolę nad metabolizmem komórki bakteryjnej i umożliwia syntezę nowych cząstek fagowych, która obejmuje proces replikacji materiału genetycznego faga i produkcję białek strukturalnych kapsydu, osłonki i ogonka faga [106,107]. Następnie materiał genetyczny fagów potomnych jest pakowany do kapsydów, które łączą się ze złożonymi oddzielnymi ogonkami. W wyniku replikacji faga komórka gospodarza stopniowo ulega osłabieniu w wyniku działania fagowych enzymów litycznych, które powodują przerwanie ciągłości struktur komórkowych, uwalniając wiriony potomne. Liza bakterii powoduje jej śmierć, a nowo uwolnione cząstki fagowe rozpoczynają kolejny cykl lityczny [107,108]. Przy opracowywaniu preparatów fagowych do celów medycznych lub biokontroli bakterii w środowisku wykorzystuje się wyselekcjonowane, ściśle lityczne bakteriofagi [109].

Cykl lityczny jest dominujący w warunkach, w których bakteryjni gospodarze mogą się namnażać i osiągać duże zagęszczenie, z kolei lizogenia jest na ogół



Rysunek 5. Możliwe interakcje fag-gospodarz bakteryjny (opracowanie własne). Schemat przygotowany w programie BioRender (nr licencji: YY25U4QJ1Q).

wybijana, gdy liczebność bakterii jest niska [110]. Cykl lizogenny jest preferowany przez fagi umiarkowane (łagodne) oraz filamentowe (nitkowate) [105]. Rozwój lizogenny jest charakterystyczny dla fagów tworzących episomy autonomiczne lub integrujące z chromosomem bakteryjnym [111]. Podczas cyklu lizogenego wstrzyknięty materiał genetyczny faga replikuje się wspólnie z bakteryjnym DNA, integruje z chromosomem gospodarza lub w stanie wolnym, podobnym do plazmidu, stabilnie i długotrwale współistnieje z gospodarzem

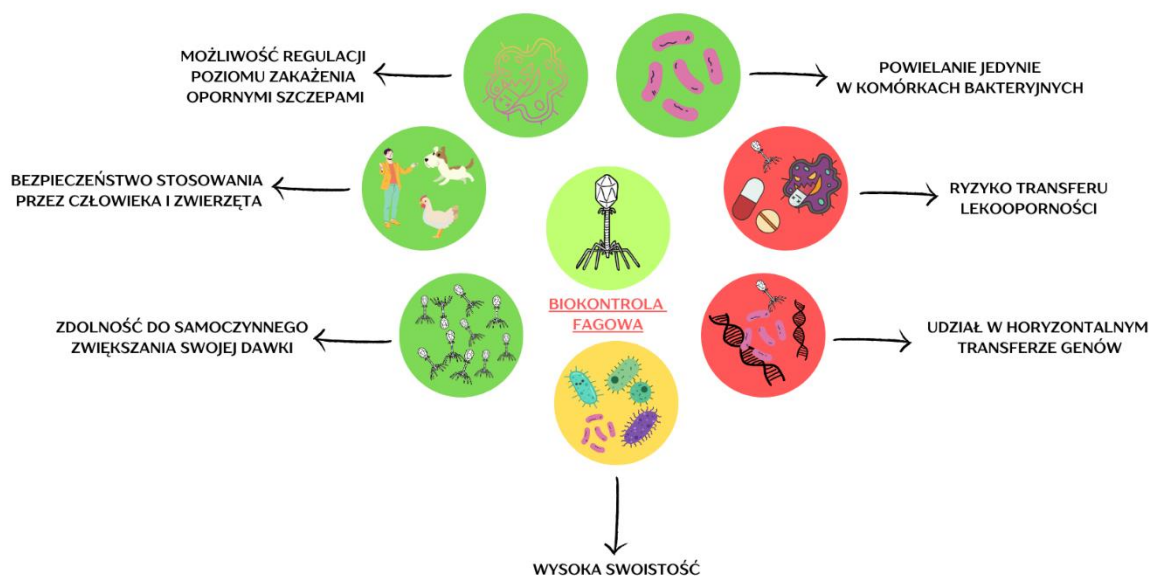
[112]. W cyklu lizogennym dominującym mechanizmem jest integracja kwasu nukleinowego faga z genomem gospodarza, co nie skutkuje bezpośrednio zniszczeniem bakterii, a fag w takiej postaci wchodzi w stan utajony (stadium profaga) [105]. Tworzenie lizogenu, czyli komórki bakteryjnej posiadającej profaga zintegrowanego ze swoim genomem, katalizowane jest przez fagowe rekombinazy zwane integrazami [113,114]. Wraz z namnażaniem bakterii powieleniu ulega również materiał genetyczny faga, jednak bez wytwarzania cząstek potomnych (utrzymuje się stan represji faga). Stan utajony może zostać przerwany spontanicznie lub być indukowany stresorami zewnętrznymi. Indukcja profagów może nastąpić poprzez działanie czynników fizycznych (np. promieniowania UV) lub chemicznych (np. mitomycyny C, czyli antybiotyku będącego inhibitorem replikacji DNA, który poprzez kowalencyjne związanie z matrycą DNA uniemożliwia jej rozplecenie) [115,116]. Czynniki te stanowią zagrożenie dla komórki bakteryjnego gospodarza i powodują indukcję reakcji stresowej, takiej jak reakcja SOS, aktywowana pod wpływem uszkodzeń DNA [111,112,117]. Wówczas profagi przechodzą ze stanu lizogenii do cyklu litycznego, gdzie dochodzi do powstania nowych cząstek fagowych i uwolnienia wirionów potomnych w wyniku lizy bakteryjnego gospodarza [105,118].

Pseudolizogenia jest alternatywną odmianą cyklu lizogennego [105]. Fag, po iniekcji materiału genetycznego, nie uczestniczy ani w cyklu litycznym, ani lizogennym i pozostaje w cytoplazmie komórki gospodarza jako niereplikujący element pozachromosomowy (w formie episomalnej: liniowej lub kolistej), który jest asymetrycznie przenoszony po podziale bakterii do jednej z komórek potomnych. Stwierdzono, że w stan nosicielstwa wchodzi różne typy fagów, zarówno zjadliwe i umiarkowane fagi dsDNA, fagi dsRNA oraz ssRNA [105]. Pseudolizogenia jest zwykle spowodowana specyficznym stanem komórki gospodarza, takim jak głód i niewystarczająca ilość dostępnej energii do ekspresji genów wirusa. Po ponownym dostarczeniu składników odżywczych stan pseudolizogenii ustępuje, a fagi rozpoczynają cykl lityczny lub lizogenny [106,112]. Stan nosicielstwa może stanowić mechanizm ochronny fagów przed niekorzystnymi warunkami fizykochemicznymi środowiska, w tym promieniowaniem UV lub wysoką temperaturą, które mogą uszkodzić ich cząstki [105].

Większość dotychczas zidentyfikowanych fagów związanych z infekcją chroniczną należy do rodziny *Inoviridae*, czyli fagów filamentowych zawierających genom w postaci ssDNA. Strategię infekcji chronicznej mogą wybierać również fagi łagodne o budowie złożonej [105,119]. Podczas infekcji chronicznej w komórce bakteryjnego gospodarza stale produkowane są potomne cząstki fagowe, które opuszczają gospodarza z wykorzystaniem mechanizmów niepowodujących lizy komórek [105]. Potomne cząstki fagowe są transportowane na zewnątrz komórki bakteryjnej przez wyspecjalizowane kompleksy białkowe. Synteza fagów potomnych jest dla gospodarza dużym wydatkiem energetycznym, co wpływa na osłabienie żywotności i pogorszenie stanu fizjologicznego jego komórek [120].

2.3.3. Korzyści i zagrożenia związane z wykorzystaniem bakteriofagów w przemyśle spożywczym

Zastosowanie fagów i/lub ich enzymów do zwalczania zakażeń o etiologii bakteryjnej znane jest jako terapia fagowa. Ten rodzaj terapii ma znaczną przewagę nad antybiotykoterapią [105,121]. Poza wieloma zaletami, z wykorzystaniem fagów związane są również pewne zagrożenia, które powinny zostać uwzględnione podczas typowania fagów przy opracowywaniu biopreparatów do skutecznej biokontroli (**Rysunek 6.**).



Rysunek 6. Korzyści i zagrożenia związane z wykorzystaniem bakteriofagów jako czynników biokontroli żywności (opracowanie własne). Schemat przygotowany w programie Canva.

Bakteriofagi, jako wirusy prokariotyczne, mają zdolność powielania swoich cząstek jedynie w komórkach bakteryjnych, zatem nie są zagrożeniem dla komórek człowieka, zwierząt i innych organizmów eukariotycznych [105,122]. Bakteriofagi stanowią część ludzkiego mikrobiomu jelitowego [123], są również izolowane z krwi, dróg moczowo-płciowych, dróg oddechowych, skóry czy płynu mózgowo-rdzeniowego [124]. Bakteriofagi są najliczniejszym składnikiem mikrobioty jelitowej – szacuje się, że w przewodzie pokarmowym człowieka na fageom składa się około 10^{15} cząstek fagów, które odgrywają znaczącą rolę w kształtowaniu składu, funkcji i modulacji ludzkiego mikrobiomu jelitowego [125]. Zdrowe osoby posiadają unikalny fageom i jedynie około 5% stanowią fagi stanowiące rdzeń wspólny dla wszystkich ludzi [126]. W wielu pracach zwraca się uwagę na możliwe interakcje pomiędzy bakteriofagami i komórkami eukariotycznymi wpływające zarówno na procesy biochemiczne, jak i fizjologiczne [124,127]. Fagi mogą również modulować ekspresję niektórych genów w komórkach eukariotycznych [124,128]. Działanie terapeutyczne preparatów fagowych może być związane nie tylko z efektem bakteriobójczym fagów, ale również dotyczyć stymulacji komórek układu odpornościowego i zwiększonej zdolności do proliferacji pod wpływem mitogenów [129]. Składniki

lizatów fagowych, zawierających pozostałości komórek bakteryjnych po lizie, np. endotoksyny bakteryjne, mają również wpływ na układ odpornościowy [128,130]. Badania wykazały, że fagi mają właściwości immunomodulacyjne (związane z funkcją fagocytów, m.in. fagocytozą, wytwarzaniem ROS lub proliferacją limfocytów T) [111,124,127] i immunogenne (związane m.in. z wytwarzaniem specyficznych przeciwciał przeciwko antygenom fagów). Mogą oddziaływać z komórkami odporności wrodzonej, prowadząc m.in. do indukcji fagocytozy oraz modulacji poziomów uwalnianych przez nie przeciwdrobnoustrojowych białek, a także z innymi komórkami układu immunologicznego (wpływając na produkcję cytokin). Dzięki budowie nukleoproteinowej, bakteriofagi są rozpoznawane przez komórki układu odpornościowego, co prowadzi do ich neutralizacji i usuwania z organizmu [128]. Dodatkowo mogą modulować nabytą odpowiedź immunologiczną, której efektem jest wytwarzanie przeciwciał antyfagowych [123,124].

Do zalet stosowania bakteriofagów należy również ich zdolność do samoczynnego zwiększania swojej dawki; są samoreplikujące i gromadzą się tam, gdzie mają dostęp do swoich bakteryjnych gospodarzy [129,130]. Istotną korzyścią związaną z wykorzystaniem bakteriofagów jest ich skuteczność wobec bakterii wielolekoopornych, co pozwala regulować poziom zakażeń szczepami opornymi [130,131]. Ponadto fagi wykazują skuteczność wobec biofilmów bakteryjnych, przez co umożliwiają dostęp innym środkom przeciwbakteryjnym [132,133]. Bakteriofagi cechuje również wysoka swoistość, co może stanowić zarówno ich zaletę, jak i wadę. Z uwagi na ich aktywność ukierunkowaną na ściśle określony gatunek lub szczep bakterii, do biokontroli w przemyśle rolno-spożywczym należy opracowywać preparaty zawierające koktajl różnych fagów o możliwie szerokim spektrum aktywności wobec bakteryjnych gospodarzy [134]. Z drugiej strony, szczepowa specyficzność bakteriofagów ogranicza ich destrukcyjną aktywność wobec bakterii wykorzystywanych w przemyśle biotechnologicznym lub spożywczym, np. kultur starterowych w mleczarstwie [135,136]. Wykorzystanie koktajlów zawierających wiele bakteriofagów i/lub fagi poliwalentne (tj. o zwiększonym zakresie bakteryjnych gospodarzy) może prowadzić do złożonych zjawisk farmakologicznych i wywołać efekt antagonistyczny, którego skutkiem będzie działanie bakteriostatyczne zamiast bakteriobójczego [134].

Przy opracowywaniu biopreparatów dla przemysłu rolno-spożywczego i bioremediacji, należy poszukiwać i typować jedynie fagi wirulentne [137]. Z uwagi na charakter integracji fagów z gospodarzem bakteryjnym, w cyklu lizogennym możliwy jest udział fagów w HGT i przekazywaniu ARGs [111,138]. Profagi kodują w obrębie wysp patogenności (PAI), czyli podgrupy wysp genomowych (GEI), liczne czynniki wirulencji, a patogenność niektórych bakterii jest wynikiem konwersji lizogennej [139,140]. Przykładowo, za chorobotwórczość bakterii *Vibrio cholerae* odpowiedzialne są transdukujące fagi CTXΦ oraz VPIΦ,

zwane cholerafagami, które w swoich genomach przenoszą kasetę wirulencji patogenu [141].

W toku ewolucji bakterie wykształciły szereg mechanizmów ochronnych przed fagami, które działają na różnych etapach infekcji [142,143]. Mechanizm inhibicji adsorpcji może wiązać się z fizycznym maskowaniem receptorów, zmianami w ich budowie bądź ich brakiem [143,144]. Innymi mechanizmami ochronnymi są blokowanie iniekcji fagowego materiału genetycznego (mechanizm wykluczający nadkażenie, Sie) [144] oraz system abortywnej infekcji (Abi), który działa na terenie cytoplazmy komórki bakteryjnej i na różnych etapach infekcji może zatrzymać cykl powielania cząstek fagowych [144,145]. System restrykcji i modyfikacji to kolejny mechanizm ochronny, który polega na rozpoznawaniu i niszczeniu obcego materiału genetycznego na drodze endonukleolitycznego trawienia [146]. Mechanizm CRISPR/Cas z udziałem endonukleaz kodowanych w chromosomie bakteryjnym, celowo degraduje obcy kwas nukleinowy, zapobiegając lizie komórki bakteryjnej [143]. Mechanizm systemu operonu ochronnego DISARM polega na metylacji DNA bakterii, po której następuje modyfikacja restrykcyjna genomu faga [147]. Podobny do operonu DISARM mechanizm działania wykazuje system BREX, który polega na metylacji DNA bakterii i blokowaniu integracji i/lub replikacji faga [148,149]. W ostatnim czasie odkryto nowe bakteryjne systemy przeciwfagowe, jednak ich dokładny mechanizm działania pozostaje nieznany i wymaga dalszych badań na poziomie molekularnym [150,151].

Bakteriofagi i bakterie rywalizują o przetrwanie w środowisku. Fagi koewoluują by przezwyciężyć mechanizmy przeciwwirusowe swoich gospodarzy – potrafią rozpoznawać i opracowywać alternatywy dla zmienionych receptorów bakteryjnych oraz skutecznie przylegać do komórki bakteryjnego gospodarza [152]. Zmiany w receptorach bakteryjnych powodują wytwarzanie przez fagi enzymów z klas liaz i hydrolaz [153]. Ponadto fagi mogą ominąć wytwarzane przez bakterie systemy zależne od modyfikacji i wykorzystać własny system anty-CRISPR przeciwko nabytej oporności bakterii oraz unikać systemów CRISPR-Cas poprzez mutacje w sekwencjach PAM [152,154]. Mechanizmami zapobiegającymi systemowi abortywnej infekcji są mutacje w genach metabolizmu nukleotydów, które pozwalają uciec fagom przed mechanizmem AbiQ [152].

Dlatego też biopreparaty fagowe powinny spełniać restrykcyjne wymagania dotyczące ich bezpieczeństwa: a) bakteriofagi wchodzące w skład biopreparatu powinny posiadać status organizmów generalnie uznawanych za bezpieczne (GRAS); b) wykazywać ściśle lityczny (wirulentny) charakter; c) w przypadku biokontroli bakterii patogennych powinny wykazywać możliwość do namnażania swoich fagów potomnych w komórkach niepatogennego gospodarza oraz d) nie zawierać w swoim genomie żadnych genów związanych z toksynami i opornością na antybiotyki [155]. Z drugiej strony bakteriofagi wykorzystywane do przygotowania biopreparatów fagowych powinien charakteryzować szeroki

zakres bakteryjnych gospodarzy, wysoka stabilność podczas przechowywania w różnych środowiskach (tj. szeroki zakres pH, temperatury, oporność na działanie enzymów przewodu pokarmowego) oraz możliwość powielania cząstek potomnych do wysokiego miana [156–158]. Biopreparaty fagowe mogą znaleźć zastosowanie w trzech sektorach przemysłu rolno–spożywczego: a) produkcji pierwotnej obejmującej hodowlę zwierząt i uprawę polową; b) biosanitacji, głównie w zakładach produkcyjnych, w celu zapobiegania tworzenia biofilmów na powierzchni sprzętu oraz c) biokonserwacji, której celem jest przedłużenie trwałości mikrobiologicznej żywności poprzez ograniczenie wzrostu bakterii saprofitycznych i patogennych [159,160].

Pomimo braku dopuszczenia do stosowania w UE biopreparatów bakteriofagowych, w obliczu globalnej antybiotykooporności, wiele ośrodków naukowych prowadzi badania nad opracowaniem nowych, skutecznych środków biokontroli bakterii w całym łańcuchu żywnościowym. Wybrane badania przedstawiono w **publikacjach [P2] oraz [P5]**.

2.3.4. Aspekty prawne związane z wykorzystaniem bakteriofagów w przemyśle rolno–spożywczym

Jedynymi ośrodkami naukowymi na terenie UE wykorzystującymi bakteriofagi w celach terapeutycznych są Ośrodek Terapii Fagowej przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu [80,161,162] oraz szpital wojskowy Queen Astrid w Brukseli [163]. Pomimo wieloletnich badań dotyczących zarówno biologii bakteriofagów, jak i ich wpływu na układ immunologiczny człowieka, terapia fagowa w Polsce jest realizowana jedynie w formie terapii eksperymentalnej, w żaden sposób niedofinansowanej przez Państwo [161,164]. W przypadku wykorzystania bakteriofagów jako czynników przeciwbakteryjnych w sektorze rolno–spożywczym, ich zastosowanie również jest silnie ograniczone. Pomimo wielu udanych prób zastosowania bakteriofagów w biokontroli żywności, ich dodatek do produktów spożywczych jest dozwolony tylko w niektórych krajach, a przepisy dotyczą jedynie skomercjalizowanych produktów na bazie bakteriofagów [165]. W UE preparaty bakteriofagowe nie zostały zatwierdzone do stosowania w bezpośrednim kontakcie z żywnością [160,166]. Natomiast wiele krajów spoza UE, w tym USA, Brazylia, Holandia, Izrael, Kanada, Szwajcaria, Australia i Nowa Zelandia zatwierdziło wprowadzenie biopreparatów fagowych do użycia i obrotu w przemyśle spożywczym [167,168]. Preparaty zatwierdzone przez FDA jako środki ochrony mikrobiologicznej żywności to m.in. Listex™ P100, Secure Shield E1, EcoShield™, ListShield™, ShigaShield™ oraz SalmoFresh™, zaś USDA zaakceptowało m.in. produkty Ecolicide®, SalmoFresh™, Finalyse® [167–169]. Dla dziesięciu komercyjnych preparatów fagowych FDA przyznała status GRAS [170]. Niektóre komercyjne biopreparaty fagowe posiadają certyfikaty koszerności oraz Halal, a także są dopuszczone do stosowania przy produkcji

żywności ekologicznej [167]. Polska firma Proteon Pharmaceuticals S.A. z Łodzi również opracowuje i sprzedaje biopreparaty fagowe do stosowania jako dodatki paszowe w hodowli zwierząt [171]. Preparat pod nazwą handlową Bafasal® zawierający cztery ściśle lityczne bakteriofagi specyficzne wobec pałeczek z rodzaju *Salmonella*, który otrzymał pozytywną opinię Panelu ds. Dodatków i Produktów lub Substancji Wykorzystywanych w Paszach dla Zwierząt (FEEDAP) jest stosowany do wody pitnej i płynnej paszy uzupełniającej dla wszystkich gatunków ptaków [172].

W 2016 roku Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) opublikował raport [173], w którym potwierdził bezpieczeństwo toksykologiczne i skuteczność stosowania preparatu Listex™ P100 (wobec *Listeria monocytogenes*) firmy PhageGuard (Microes Food Safety); jednocześnie zalecił przeprowadzenie większej liczby badań dotyczących jego skuteczności. W USA w przypadku stosowania tego biopreparatu na produkty gotowe do spożycia oraz mięso i drób, nie ma konieczności umieszczania na etykiecie informacji o jego dodatku jeżeli producent żywności stosuje dopuszczalne dawki (tj. do 10^9 PFU g⁻¹). Innym skomercjalizowanym biopreparatem ukierunkowanym na eliminację *L. monocytogenes* jest ListShield™ firmy Intralytix Inc., który w swoim składzie zawiera sześć bakteriofagów (tj. LIST-36, LMSP-25, LMTA-34, LMTA-57, LMTA-94 oraz LMTA-148). ListShield™ jest wykorzystywany jako biokonserwant żywności, do obróbki żywności lub jako środek pomocniczy w przetwórstwie żywności, takich jak ryb i skorupiaki, świeże i przetworzone owoce/warzywa oraz produkty mleczne w stężeniu do 10^6 PFU g⁻¹ [165,174].

3. HIPOTEZY BADAWCZE, CEL I ZAKRES PRACY

Rosnący problem związany z transmisją antybiotykooporności wśród szczepów bakteryjnych stanowiących mikrobiotę żywności stanowi uzasadnioną potrzebę opracowania alternatywnych metod utrwalania żywności ukierunkowanych na skuteczną eliminację wzrostu i/lub rozwoju bakterii w żywności. Obecnie przemysł biotechnologiczny dąży do opracowania i komercjalizacji biopreparatów zawierających specyficzne bakteriofagi lityczne ukierunkowane na eliminację bakterii patogennych w żywności. W przypadku bakterii saprofitycznych, których wzrost i rozwój w środowisku produktu powodują obniżenie jego jakości i skrócenie terminu przydatności do spożycia, opracowanie skutecznych preparatów bakteriofagowych pozostaje nadal nierozwiązanym problemem. Należy podkreślić, że bakterie saprofityczne obecne w matrycy produktu mogą stanowić również wektor transmisji genów oporności na antybiotyki, przyczyniać się do rozprzestrzeniania antybiotykooporności tych bakterii w łańcuchu żywnościowym oraz stanowić źródło zagrożenia dla bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności i zdrowia konsumentów.

Dlatego też głównym celem badań podjętych w mojej pracy doktorskiej była **ocena możliwości wykorzystania bakteriofagów litycznych w biokontroli żywności minimalnie przetworzonej pochodzenia roślinnego**. Określiłem skalę problemu występowania szczepów antybiotykoopornych w łańcuchu żywnościowym, a następnie podjąłem próbę wyizolowania wirulentnych bakteriofagów i sprawdzenia efektywności ich działania na poziomie eliminacji (zahamowania/ograniczenia wzrostu i rozwoju) zarówno szczepów saprofitycznych, jak i patogennych występujących w minimalnie przetworzonych produktach roślinnych oferowanych na rynku spożywczym.

Do osiągnięcia celu głównego sformułowałem dwie **hipotezy badawcze**:

HIPOTEZA 1: Gram-ujemne bakterie występujące w łańcuchu żywnościowym cechuje nabyta oporność na powszechnie stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe, co decyduje o ich znacznym udziale w transferze antybiotykooporności w środowisku żywności.

HIPOTEZA 2: Bakteriofagi lityczne o szerokim zakresie bakteryjnych gospodarzy są skuteczną metodą biokontroli bakterii saprofitycznych i patogennych, w tym wielolekoopornych, w środowisku żywności.

W celu weryfikacji hipotez badawczych określiłem następujące **cele szczegółowe** – **zadania badawcze**:

1. Genetyczną identyfikację i klasyfikację wybranych szczepów bakterii z rzędu *Enterobacterales* wyizolowanych z łańcucha żywnościowego.
2. Określenie profili oporności na wybrane antybiotyki oraz mechanizmów antybiotykooporności pałeczek z rzędu *Enterobacterales*.
3. Określenie aktywności wyizolowanych bakteriofagów oraz zakresu bakteryjnych gospodarzy.
4. Analizę morfologiczną i charakterystykę genomyczną wytypowanych bakteriofagów.
5. Ocenę skuteczności koktajlu bakteriofagowego w poprawie jakości mikrobiologicznej wybranych minimalnie przetworzonych matryc żywnościowych.

4. MATERIAŁ DOŚWIADCZALNY I METODY BADAŃ

4.1. Materiał biologiczny

Wszystkie szczepy bakteryjne wykorzystane w badaniach włączono do depozytu publicznego lub pochodziły z zasobów Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych – Centrum Zasobów Mikrobiologicznych Zakładu Mikrobiologii Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego (IBPRS-PIB). Szczepy bakterii saprofitycznych wyizolowano z komercyjnie dostępnych minimalnie przetworzonych produktów spożywczych pochodzenia roślinnego, tj. rukoli, mieszanki sałat z marchewką, mieszanki sałat z burakiem (wykorzystane w publikacjach [P1], [P2] oraz [P5]), szpinaku mytego i szpinaku niemytego (wykorzystane w publikacjach [P2] oraz [P5]). Szczepy pałeczek *Salmonella* wyizolowano w latach 1981–2018 w ramach prac badawczych i działalności komercyjnej realizowanych w IBPRS-PIB i pochodziły one z różnych ogniw łańcucha żywnościowego (izolaty odzwierzęce, pomieszczenia hodowli zwierząt, linie produkcyjne żywności, produkty spożywcze oraz hospitalizowani pacjenci; wykorzystane w publikacjach [P4] oraz [P5]). Dodatkowo, w 2022 roku z produktu spożywczego wyizolowano szczep *Salmonella* Sandiego KKP 3882, który razem z innymi serowarami wykorzystano w badaniu zakresu bakteryjnych gospodarzy bakteriofagów (publikacja [P5]). W publikacji [P5] do badania spektrum litycznego bakteriofagów wykorzystano również inne patogenne bakterie Gram-ujemne (tj. *Pseudomonas aeruginosa* KKP 994 wyizolowany z krwi, *P. aeruginosa* KKP 1593 wyizolowany z otrębów) oraz Gram-dodatnie (tj. *L. monocytogenes* KKP 1845 wyizolowany od hospitalizowanego pacjenta, *L. monocytogenes* KKP 3270 wyizolowany z linii produkcyjnej, *Staphylococcus aureus* KKP 995 wyizolowany z gleby, *S. aureus* KKP 1082 wyizolowany z ekstraktu słodowego).

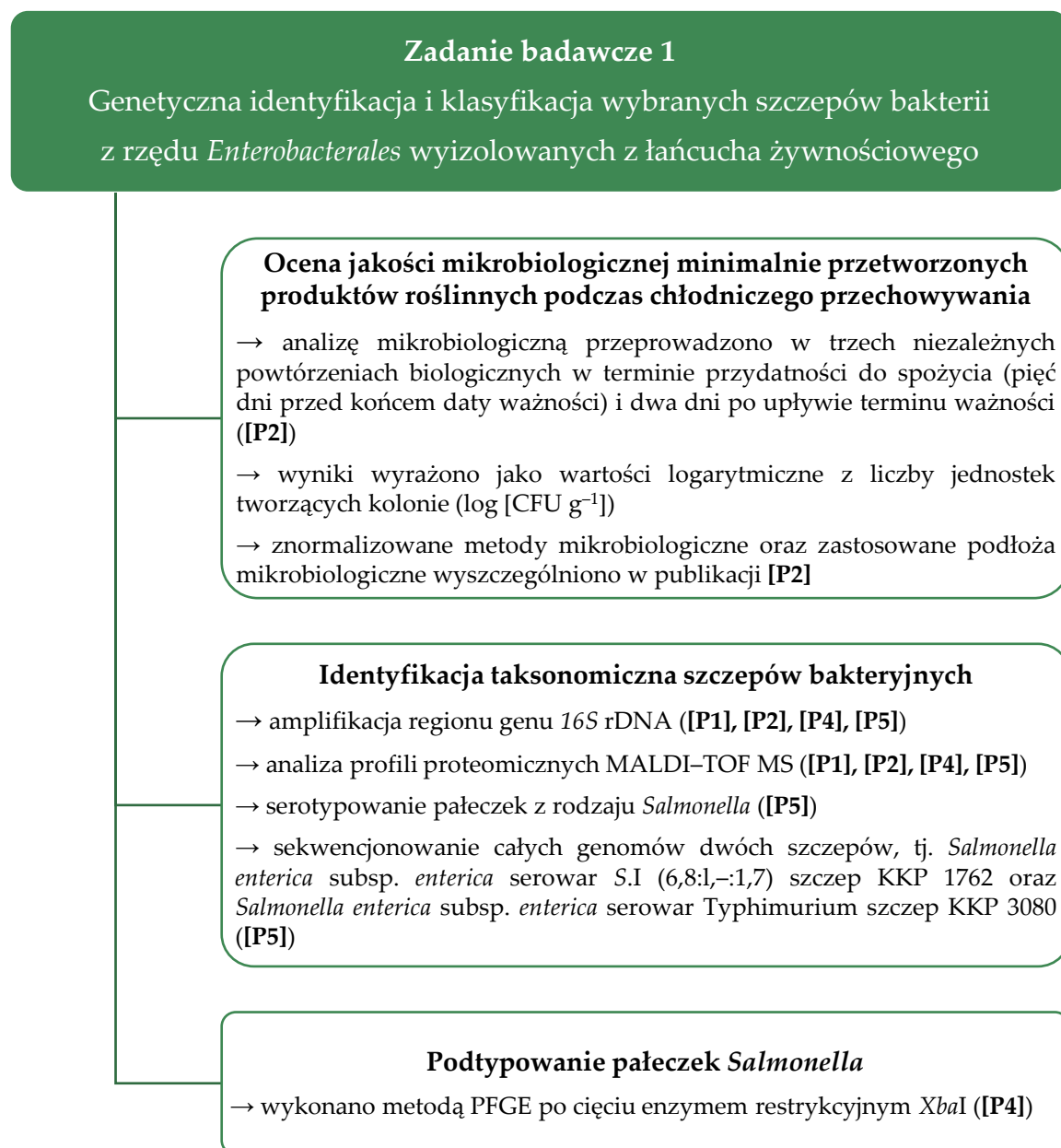
4.2. Materiał badany

Koktajle bakteriofagowe zaaplikowano do różnych matryc żywnościowych. Celem określenia skuteczności bakteriofagów w eliminacji bakterii saprofitycznych, koktajle fagowe zastosowano do biokontroli rukoli, mieszanki sałat z marchewką, mieszanki sałat z burakiem, szpinaku mytego i szpinaku niemytego (publikacja [P2]). Skuteczność koktajlu fagowego w redukcji liczby pałeczek *Salmonella* sprawdzono w minimalnie przetworzonych sokach warzywno-owocowych: tj. soku marchwiowo-mango-jabłkowym utrwalanym

techniką HHP oraz świeżo wyciskany sok marchwiowo-jabłkowy (publikacja [P5]).

4.3. Metody badań

W niniejszym rozdziale w formie schematów przedstawiono skróconą metodykę dla poszczególnych etapów realizacji zadań badawczych. Szczegółowe opisy zastosowanych metod badawczych oraz schematy postępowania zaprezentowano w rozdziale *Materiały i Metody* w poszczególnych artykułach wchodzących w skład cyklu publikacji stanowiących niniejszą rozprawę doktorską.



Zadanie badawcze 2

Określenie profili oporności na wybrane antybiotyki oraz mechanizmów antybiotykooporności pałeczek z rzędu *Enterobacterales*

Detekcja genów wirulencji *Salmonella*

→ szczepy *Salmonella* zbadano pod kątem obecności sześciu genów związanych z patogennością (tj. *invA*, *fimA*, *stn*, *spvC*, *spvR* i *rck*) ([P4])

Badanie fenotypowej wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe

→ metodą dyfuzyjno–krążkową Kirby’ego–Bauera na agarze Muellera–Hintona określono wrażliwość na 28 antybiotyków należących do ośmiu różnych klas ([P2], [P4])

→ interpretacji dokonano zgodnie z wytycznymi EUCAST

→ jako szczep referencyjny (kontrolę negatywną) wykorzystano *Escherichia coli* ATCC 25922

→ szczepy sklasyfikowano jako izolaty MDR oraz wyznaczono wskaźniki MAR

Oznaczenie profilu genotypowej oporności na antybiotyki

→ szczepy *Salmonella* sprawdzono pod kątem obecności 25 genów oporności na antybiotyki ([P4])

→ jako szczep referencyjny (kontrolę negatywną) wykorzystano *Escherichia coli* ATCC 25922

Badanie przesiewowe pod kątem wykrywania szczepów wytwarzających β -laktamazy

→ fenotypową oporność na antybiotyki β -laktamowe pod kątem wytwarzania ESBL przeprowadzono testem DDST na agarze Muellera–Hintona oraz na podłożu chromogonnym CHROMagar ESBL ([P2], [P4])

→ fenotypową oporność na antybiotyki β -laktamowe pod kątem wytwarzania karbapenemaz sprawdzono na podłożu chromogennym CHROMagar mSuperCARBA ([P2], [P4])

→ u pałeczek *Salmonella* dokonano detekcji pięciu genów *bla* (tj. *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CMY-2} i *bla*_{PSE-1}) związanych z opornością na antybiotyki β -laktamowe ([P4])

→ jako szczep referencyjny (kontrolę negatywną) wykorzystano *Escherichia coli* ATCC 25922

Zadanie badawcze 3

Określenie aktywności wyizolowanych bakteriofagów oraz zakresu bakteryjnych gospodarzy

Izolacja, namnażanie i oczyszczanie bakteriofagów

- izolację fagów przeprowadzono ze ścieków komunalnych ([P1], [P2], [P5])
- procedurę oczyszczania wykonano w buforze SM metodą pasażowania lizatów
- stężenie fagów (miano fagów) określono metodą płytek dwuwarstwowych i wyrażono jako wartość logarytmiczna z liczby jednostek tworzących łyśinki ($\log [\text{PFU ml}^{-1}]$)

Określenie spektrum litycznego dla wyizolowanych bakteriofagów

- do oceny aktywności fagów zastosowano test punktowy (ang. *spot test*)
- spektrum lityczne fagów wyizolowanych wobec bakterii saprofitycznych oceniono na panelu 25 gospodarzy (**wyniki przedstawiono w rozdziale 5.**)
- spektrum lityczne fagów wyizolowanych wobec bakterii saprofitycznych oceniono na panelu 81 gospodarzy ([P5])
- powstałe łyśinki oceniono jako klarowne, mętne lub obserwowano brak tworzenia łyśinek

Badanie parametrów fizjologicznych fagów

- dla salmofagów wyznaczono krzywe jednostopniowego wzrostu (ang. *one-step growth*), krzywe adsorpcji do komórek bakteryjnych gospodarzy oraz obliczono stałe szybkości adsorpcji (k) ([P5])

Zmiany w kinetyce wzrostu bakteryjnych gospodarzy po infekcji fagowej

- do wyznaczenia kinetyki wzrostu bakteryjnych gospodarzy wykorzystano automatyczny analizator wzrostu Bioscreen C ([P1], [P2]) lub Bioscreen C Pro ([P5])
- dla bakteryjnych gospodarzy przy każdym zastosowanym MOI wyznaczono współczynniki właściwej szybkości wzrostu (μ)

Wpływ czynników środowiskowych na zachowanie aktywności bakteriofagów

- określono wpływ temperatury, kwasowości czynnej (pH) oraz czasu ekspozycji na promieniowanie UV na zachowanie aktywności badanych bakteriofagów ([P1], [P5], **wyniki wpływu czasu ekspozycji na aktywność fagów wobec bakterii saprofitycznych przedstawiono w rozdziale 5.**)

Zadanie badawcze 4

Analiza morfologiczna i charakterystyka genomyczna wytypowanych bakteriofagów

Badanie morfologii wirionów fagowych

→ morfologię cząstek fagowych oceniono z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) w barwieniu negatywnym kwasem fosforowolframowym, chlorkiem żelaza (II) ([P1]) lub octanem amonu ([P1], [P5])

Izolacja genomowego DNA bakteriofagów

→ do izolacji genomowego DNA bakteriofagów specyficznych wobec bakterii saprofitycznych wykorzystano zestaw QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Niemcy) ([P1])

→ genomowe DNA salmofagów, po etapie precypitacji, wyizolowano zestawem odczynników PureLink™ RNA/DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ([P5])

→ czystość wyizolowanego DNA określono za pomocą spektrofotometru Nanodrop ND-1000, a stężenie DNA oznaczono ilościowo za pomocą fluorymetru Qubit 4.0 przy użyciu zestawu Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, USA) ([P1], [P5])

Sekwencjonowanie genomów fagowych i analizy bioinformatyczne

→ biblioteki DNA fagów specyficznych wobec bakterii saprofitycznych przygotowano przy użyciu zestawu Illumina DNA Prep Kit (Illumina, USA), a sekwencjonowanie wykonano na platformie MiSeq do NGS ([P1])

→ biblioteki DNA salmofagów przygotowano przy użyciu odczynników Rapid Barcoding Kit (Oxford Nanopore Technologies, Wielka Brytania), a sekwencjonowanie NGS w technologii nanoporowej wykonano na sekwenatorze GridION X5 ([P5])

→ w złożonych genomach fagów dokonano predykcji genów związanych z czynnikami wirulencji, genów oporności na antybiotyki, genów toksyn, genów integrazy, rekombinazy oraz represorów, które są markerami bakteriofagów umiarkowanych ([P1], [P5])

Zadanie badawcze 5

Ocena skuteczności koktajlu bakteriofagowego w poprawie jakości mikrobiologicznej wybranych minimalnie przetworzonych matryc żywnościowych

Aplikacja koktajlów fagowych do minimalnie przetworzonych matryc żywnościowych

→ do utrwalania sałat zastosowano koktajl 43 bakteriofagów specyficznych wobec bakterii saprofitycznych, który zaaplikowano w formie bezpośredniego natrysku lub we wkładce absorpcyjnej nasączonej biopreparatem ([P2])

→ minimalnie przetworzone soki warzywno-owocowe celowo zakażone pałeczkami z rodzaju *Salmonella* utrwalono poprzez aplikację pojedynczych bakteriofagów lub czterofagowego koktajlu ([P5])

→ podczas przechowywania monitorowano zmiany w ogólnej liczbie bakterii ([P2]) lub liczbie pałeczek z rodzaju *Salmonella* ([P5]), a wyniki wyrażono jako wartość logarytmiczna z liczby jednostek tworzących kolonie ($\log [\text{CFU g}^{-1}]$ lub $\log [\text{CFU ml}^{-1}]$)

4.4. Analizy statystyczne

Wszystkie doświadczenia wykonano przynajmniej w trzech powtórzeniach. Do oceny wpływu wybranych czynników fizycznych i chemicznych na aktywność bakteriofagów, której wyniki przedstawiono w **publikacji [P1]**, zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i test Duncana ($p \leq 0,05$) w programie SAS v9.2. Analizy statystyczne wyników zaprezentowanych w **publikacji [P2]** przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Statistica v13.3. Przy analizach jakości mikrobiologicznej produktów wykorzystano jednoczynnikową ANOVA i test *post hoc* Tukeya ($p \leq 0,05$). Do analizy statystycznej po aplikacji koktajlu fagowego do matryc żywnościowych wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji z 95% przedziałem ufności ($\alpha = 0,05$). Wyniki omówione w **publikacji [P5]** przedstawiono graficznie i opracowano statystycznie w programie Graph Prism v9.4.1. Wpływ fagów o różnych współczynnikach MOIs na kinetykę wzrostu bakteryjnych gospodarzy przeanalizowano z wykorzystaniem dwuczynnikowej ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Dunnetta z 95% przedziałem ufności ($\alpha = 0,05$). Do analizy wpływu wybranych czynników fizycznych lub chemicznych na aktywność fagów wykorzystano jednoczynnikową ANOVA, a następnie test Tukeya z 95% przedziałem ufności ($\alpha = 0,05$). Do analizy wpływu aplikacji koktajlu fagowego na zmiany liczby pałeczek *Salmonella* wykorzystano wielokrotny test *t*-Studenta, a następnie metodę Benjaminiego, Kriegera i Yekutieli, z poprawką na wielokrotne porównania metodą Holma-Sidaka z 95% przedziałem ufności ($\alpha = 0,05$).

5. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ BADAWCZYCH PRZEDSTAWIONYCH DO OCENY

5.1. Genetyczna identyfikacja i klasyfikacja wybranych szczepów bakterii z rzędu *Enterobacterales* wyizolowanych z łańcucha żywnościowego

Bakterie saprofityczne wykorzystane w badaniach (**publikacje [P1]** oraz **[P2]**) wyizolowano z minimalnie przetworzonych produktów roślinnych na etapie oceny jakości mikrobiologicznej tych produktów podczas chłodniczego przechowywania. W **publikacji [P2]** w **Tabeli 1** przedstawiono zbiorcze wyniki oceny jakości mikrobiologicznej badanych produktów w terminie i po upływie terminu przydatności do spożycia w podziale na ogólną liczbę drobnoustrojów psychrofilnych i/lub psychrotrofowych, ogólną liczbę drobnoustrojów mezofilnych, liczbę bakterii kwaszących, liczbę bakterii z grupy *coli* oraz liczbę bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. W żadnym z produktów nie stwierdzono obecności bakterii patogennych. Na podstawie oceny jakości mikrobiologicznej badanych produktów podjęto próbę izolacji bakteriofagów przeciwko dominującym bakteriom z rodziny *Enterobacteriaceae*. Najwyższy poziom zanieczyszczenia bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* w terminie przydatności do spożycia cechował szpinak myty oraz mieszankę sałat z marchewką (odpowiednio $6,31 \pm 0,08$ CFU g⁻¹ oraz $6,26 \pm 0,51$ CFU g⁻¹). Podczas chłodniczego przechowywania liczba bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* wzrosła średnio o 1–2 jednostki log. W **publikacji [P2]** w **Tabeli 2** przedstawiono listę czterdziestu trzech szczepów bakterii należących do rzędu *Enterobacterales* i rodzin *Enterobacteriaceae* ($n = 23$), *Yersiniaceae* ($n = 14$) oraz *Erwiniaceae* ($n = 6$), które wyizolowano i oczyszczono z agarów Endo oraz VRBG i wobec których w kolejnych etapach badań poszukiwano specyficznych bakteriofagów (pierwotne założenie dotyczące izolacji bakteriofagów tylko wobec Gram–ujemnych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* po zmianach taksonomicznych rozszerzono do rzędu *Enterobacterales*). Identyfikacja genetyczna (amplifikacja regionu genu 16S rDNA) większości szczepów bakterii była zgodna z identyfikacją w oparciu o analizę profili proteomicznych (techniką MALDI–TOF MS). W przypadku trzech szczepów (tj. *Citrobacter* sp. KKP 581, *Enterobacter* sp. KKP 3891 i *Enterobacter* sp. KKP 3892) identyfikacja genetyczna pozwoliła na ich zaklasyfikowanie jedynie do poziomu rodzaju, co mogło być związane z bliskim pokrewieństwem filogenetycznym szczepów należących do rodzajów *Citrobacter* i *Enterobacter*. W przypadku szczepu *Enterobacter ludwigii* KKP 3083, identyfikacja w oparciu o technikę MALDI–TOF MS sklasyfikowała go jako przedstawiciela bakterii z gatunku *Klebsiella oxytoca* (na poziomie 84,4% dopasowania, co wpływa na niewiarygodność wyniku identyfikacji). Analiza MALDI–TOF MS w przypadku

kilku szczepów zaklasyfikowała je do poziomu rodzaju, co mogło mieć związek z technologią przetwarzania żywności (np. podczas obróbki produktów spożywczych komórki bakteryjne mogą zostać uszkodzone, co wpływa na wynik identyfikacji na podstawie profili białkowych). Cztery z wyizolowanych bakterii saprofitycznych wykorzystane do izolacji i analizy bakteriofagów w **publikacji [P1]** scharakteryzowano zgodnie z klasyfikacją Bergey'a, sprawdzono ich ruchliwość oraz możliwość fermentacji laktozy (**Tabela 1**).

Drugą grupą badanych bakterii były pałeczki z rodzaju *Salmonella*. **Publikacja [P3]** stanowi szczegółowy artykuł przeglądowy dotyczący wielolekooporności *Salmonella* na poziomie regulacji transkrypcji. We wstępie scharakteryzowano pałeczki z rodzaju *Salmonella*, ich podział taksonomiczny oraz zakres gospodarzy (**Rysunek 1**). W dalszej części artykułu opisano patogenезę *Salmonella* (**Rysunek 2**) ze szczególnym uwzględnieniem roli wysp patogenności (**Tabela 1**). W **publikacji [P4]** przedmiotem badań były szczepy pałeczek z gatunku *Salmonella enterica* wyizolowane w ramach wcześniej prowadzonych prac badawczych w IBPRS-PIB. Spośród pięćdziesięciu trzech szczepów dziewięć stanowiło izolaty odzwierzęce lub wyizolowane z pomieszczeń hodowli zwierząt, trzy wyizolowano z linii produkcyjnych żywności, trzydzieści osiem to izolaty z produktów spożywczych oraz trzy od hospitalizowanych pacjentów. W **Tabeli 4** przedstawiono wszystkie izolaty wykorzystane w badaniach. Podano rok i źródło ich izolacji, wynik identyfikacji genetycznej uzyskany na podstawie amplifikacji regionu genu *16S* rDNA oraz techniką MALDI-TOF MS. Podobnie jak w przypadku identyfikacji bakterii saprofitycznych, część wyników identyfikacji pałeczek *Salmonella* uzyskanych techniką MALDI-TOF MS określono tylko do poziomu rodzaju. Pałeczki z rodzaju *Salmonella* (wszystkie z **publikacji [P4]** oraz nowo wyizolowany szczep *S. enterica* KKP 3882) poddano serotypowaniu, a wyniki przedstawiono w **publikacji [P5]** (**Tabela 3**). Dla części szczepów (szorstkich) nie uzyskano informacji o serowarze, a pomimo prób pasażowania nie uzyskano izolatów o fenotypie gładkim. Dla dwóch szczepów (tj. *S. enterica* KKP 1608 oraz *S. enterica* KKP 1611) nie uzyskano wiarygodnego wyniku, a przypuszczalnie nowe serowary wysłano celem potwierdzenia do Instytutu Pasteura w Paryżu (w momencie składania niniejszej pracy nadal nie otrzymano raportu z wyników). W **publikacji [P5]** wykonano sekwencjonowanie pełnych genomów dla dwóch MDR szczepów pałeczek *Salmonella* (tj. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar S.I (6,8:l,-:1,7) KKP 1762 oraz *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Typhimurium KKP 3080). W genomach obu bakterii zidentyfikowano ARGs, zdarzenia związane z HGT oraz regiony związane z mobilnymi elementami genetycznymi. W genomie S.I (6,8:l,-:1,7) KKP 1762 wykryto 4 regiony oraz 156 genów profagów, w tym trzy związane z integracją z genomem gospodarza (**Rysunek 1**). Analizy bioinformatyczne wykazały

w genomie dwie macierze CRISPR, ale nie zaadnotowano żadnych związanych z nimi białek Cas. W przeciwieństwie do S.I (6,8:l,-:1,7) KKP 1762, w genomie *S. Typhimurium* KKP 3080 zidentyfikowano cztery macierze CRISPR, dziewięć genów Cas oraz jeden klaster typu I-E, który jest charakterystyczny dla rodzaju *Salmonella* [175] (**Rysunek 2**). W genomie *S. Typhimurium* KKP 3080 wykryto również 4 regiony oraz 154 geny profagów, w tym dwa związane z integracją z genomem gospodarza (**Rysunek 3**). W publikacji [P4] do oceny podobieństwa genetycznego szczepów *Salmonella* wykorzystano elektroforezę w zmiennym polu elektrycznym. Dla siedmiu szczepów w PFGE nie uzyskano wzoru restrykcyjnego. Genotypowanie szczepów *Salmonella* metodą PFGE wykazało stosunkowo dużą różnorodność izolatów, a tylko kilka testowanych szczepów posiadało ten sam wzór restrykcji (**Rysunek 1**).

Wszystkie nowo wyizolowane szczepy bakterii saprofitycznych zgłoszono w ramach depozytu publicznego do Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych – Centrum Zasobów Mikrobiologicznych Zakładu Mikrobiologii IBPRS-PIB. Ponadto sekwencje regionu genu 16S rDNA wszystkich szczepów wykorzystanych w badaniach oraz dwa kompletne genomy pałeczek *Salmonella* (tj. S.I (6,8:l,-:1,7) KKP 1762 oraz *S. Typhimurium* KKP 3080) zdeponowano w bazie danych GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

5.2. Określenie profili oporności na wybrane antybiotyki oraz mechanizmów antybiotykooporności pałeczek z rzędu *Enterobacterales*

Pałeczki z rodzaju *Salmonella* są jedną z głównych przyczyn zatruc pokarmowych wywołanych spożyciem skażonej żywności i wody. W 2021 roku w UE zgłoszono 60 050 przypadków salmonellozy, co odpowiada wskaźnikowi 15,7 zachorowań na 100 000 mieszkańców [176]. W Polsce w 2022 roku odnotowano z kolei 6 546 zachorowań, z czego 6 221 dotyczyło zatruc pokarmowych [177]. Według WHO, wśród pałeczek z rodzaju *Salmonella* wyodrębniła się grupa serowarów, które wywierają szczególny wpływ na łańcuch żywnościowy [178]. Zgodnie z Decyzją Wykonawczą Komisji 2013/652/UE w sprawie monitorowania i sprawozdawczości w zakresie oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe u bakterii zoonotycznych i komensalnych, która obowiązywała od 1 stycznia 2014 r. do grudnia 2020 r., monitorowanie oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe u *Salmonella* było obowiązkowe w przypadku głównych populacji zwierząt hodowanych w kraju i pochodzącego z nich mięsa. Ustawodawca wymagał również monitorowania szczepów wytwarzających ESBL, AmpC (chromosomalną cefalosporynazę, którą charakteryzuje zdolność do rozkładu większości antybiotyków β -laktamowych) oraz karbapenemazy

(enzymy hydrolizujące wiązanie β -laktamowe w cząsteczkach karbapenemów) [179].

Pałeczki z rodzaju *Salmonella* wykształciły wiele molekularnych mechanizmów oporności zarówno na poziomie globalnych, jak i lokalnych modulatorów transkrypcji. Rosnący wskaźnik oporności na antybiotyki u *Salmonella* stanowi poważny problem globalny, a lepsze zrozumienie mechanizmów wielolekooporności tych bakterii jest niezbędne do wyboru odpowiedniego antybiotyku celem skutecznego leczenia infekcji. Dlatego w **publikacji [P3]** podsumowano aktualny stan wiedzy dotyczący molekularnych mechanizmów kontrolujących ekspresję genów związanych z opornością pałeczek z rodzaju *Salmonella* na antybiotyki. Scharakteryzowano regulatory pełniące funkcję aktywatorów i represorów transkrypcji (białka z rodzin TetR, AraC/XylS oraz MarR, które są regulatorami pompy wypływu leku AcrAB-TolC; **Rysunek 3**) oraz dwuskładnikowe systemy transdukcji sygnału (systemy PhoPQ, CpxAR, BaeSR, EnvZ/OmpR oraz PmrAB; **Tabela 2**). Omówiono molekularne mechanizmy oporności na metale (regulatory z rodziny MerR), regulatory wielolekowej oporności na antybiotyki, globalne regulatory z rodziny LysR (systemy SpvR, LeuO, LoiA, STM0030, CysB, LtrR oraz Hrg; **Tabela 3**), a także regulatory białek histonopodobnych.

Biorąc pod uwagę wysokie ryzyko występowania bakterii wielolekoopornych w środowisku, celem badań, których wyniki omówiono w **publikacji [P4]** było określenie profili oporności na antybiotyki wśród autochtonicznych szczepów pałeczek z rodzaju *Salmonella* wyizolowanych z różnych ogniw łańcucha żywnościowego. Pałeczki z rodzaju *Salmonella* kodują liczne geny związane z patogennością tych bakterii, w tym *invA*, *fimA*, *stn*, *spvC*, *spvR* oraz *rck* (**publikacja [P4]**, **Tabela 5**). We wszystkich badanych szczepach potwierdzono obecność genów *invA*, *fimA* oraz *stn*. Zlokalizowany na SPI-1 gen *invA* jest konieczny do inwazji komórek nabłonka jelita gospodarza, wywołania reakcji zapalnej i zniszczenia bariery nabłonkowej [180–183]. Gen *fimA* koduje białko FimA, które jest niezbędne do tworzenia fimbrii typu I u *Salmonella* [184,185]. Te nitkowate struktury powierzchniowe przyczyniają się do kolonizacji komórek nabłonka żywiciela [180]. Gen *stn* z kolei koduje enterotoksynę wytwarzaną przez pałeczki *Salmonella*, związaną głównie z zakażeniami serowarami *S. Typhi*, *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* [186]. Z klinicznego punktu widzenia gen *stn* jest biomarkerem różnicującym enterotoksyczne szczepy *S. enterica* od większości szczepów *Salmonella bongori* i innych Gram-ujemnych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* [180,186,187]. U trzynastu szczepów *Salmonella* (tj. 24,5%) potwierdzono obecność genów *spvC* i *spvR*. Obecny w plazmidach i/lub chromosomach gen *spvC* promuje ogólnoustrojową proliferację patogenu i przyczynia się do jego replikacji poza jelitek cienkim. Razem z genami *invA*

i *sseL* (zlokalizowanym na SPI-2), gen *spvC* ułatwia przewidywanie ogólnej patogenności, inwazyjności i potencjału replikacyjnego *Salmonella* [188]. Produkt genu *spvR* – białko SpvR jest regulatorem systemu *spvABCD* niezbędnego dla zjadliwości ogólnoustrojowej [180]. Gen *spv* koduje także oporność na uszkodzenia makrofagów, podczas gdy przenoszone przez plazmid białko błony zewnętrznej Rck (produkt genu *rck*) nadaje oporność na zabijanie dopełniacza [189]. Co więcej, białko Rck ma zdolność promowania inwazji bakterii na komórki ssaków [190]. Ekspresja genu *rck* jest regulowana przez SdiA, regulator *quorum sensing* (QS) aktywowany przez AHLs wytwarzane przez inne bakterie [191]. Obecność genu *rck* potwierdzono u 20 (tj. 37,7%) badanych szczepów *Salmonella*. Zbliżony do uzyskanego w wyniku przeprowadzonych badań profil genów zjadliwości *Salmonella* opisali Deguenon i wsp. [192], potwierdzając obecność genów *invA*, *fimA* i *stn* we wszystkich szczepach *Salmonella*, podczas gdy geny *spvC* i *spvR* występowały odpowiednio tylko u 10% i 20% badanych izolatów.

W kolejnym etapie badań określono profil fenotypowej oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Szczepy *Salmonella* zbadano pod kątem wrażliwości na dwadzieścia osiem środków przeciwdrobnoustrojowych należących do ośmiu różnych klas antybiotyków (**publikacja [P4], Tabela 6**). Spośród zbadanych szczepów, siedem (tj. 13,2%) nie wykazało fenotypowej oporności na żaden z testowanych antybiotyków. Wszystkie szczepy były z kolei wrażliwe na meropenem (karbapenem) i lewofloksacynę (fluorochinolon). Większość szczepów *Salmonella* wykazała wskaźnik MAR poniżej 0,3, natomiast jeden ze szczepów (tj. *S. enterica* KKP 998) odznaczył się znacznie wyższą wartością tego wskaźnika (indeks MAR = 0,61). Spośród badanych szczepów aż 50,9% (tj. 27/53) izolatów była MDR. Szczep *S. enterica* KKP 998 (wyizolowany z produktu spożywczego) wykazał najszerszy profil oporności na 17 antybiotyków, należących do 6 różnych klas (tj. penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy, monobaktamy, fluorochinolony i aminoglikozydy). Szerokie profile oporności wykazały także szczepy *S. enterica* KKP 3821, KKP 1004, KKP 1044 i KKP 3080. Szczep *S. enterica* KKP 3281 (wyizolowany z pomieszczeń hodowli zwierząt) wykazał oporność na 12 środków przeciwdrobnoustrojowych należących do 5 różnych klas antybiotyków (tj. cefalosporyny, karbapenemy, monobaktamy, fluorochinolony i aminoglikozydy), natomiast pozostałe trzy szczepy (wyizolowane z produktów spożywczych) wykazały oporność na 11 testowanych antybiotyków. Szczepy *Salmonella* cechowała najwyższa oporność na antybiotyki z grupy aminoglikozydów (**Tabela 7**). Przeciwko amikacynie, gentamycynie i tobramycynie fenotypową oporność wykazało odpowiednio 31 (tj. 58,5%), 26 (tj. 49,1%) i 24 (tj. 45,3%) szczepów. Ponadto aż 14 szczepów *Salmonella* (tj. 26,4%) wykazało oporność na wszystkie badane antybiotyki z grupy aminoglikozydów (tj. amikacynę, gentamycynę i tobramycynę) (**Tabela 6**). Ceftarolina, należąca do

antybiotyków z klasy cefalosporyn V generacji o szerokim spektrum działania stosowana w leczeniu ciężkich zakażeń bakteryjnych, była najmniej skutecznym antybiotykiem, gdzie aż 32 (tj. 60,4%) spośród badanych szczepów *Salmonella* było opornych na ten chemioterapeutyk. Wysoki odsetek szczepów opornych na cefalosporyny V generacji jest sytuacją niepokojącą ze względu na ryzyko przenoszenia genów oporności do środowiska. Ceftarolina jest lekiem z wyboru wśród cefalosporyn i wykazuje aktywność wobec wielolekoopornych szczepów *S. aureus*, w tym MRSA, VRSA i VISA [193,194].

Uzyskane profile antybiotykooporności wskazują, że autochtoniczne szczepy *Salmonella* wyizolowane z różnych ogniw łańcucha żywnościowego stanowią znaczny odsetek szczepów MDR. Wyniki badań opublikowanych przez Pławińską-Czarnak i wsp. [195] potwierdzają wysoki odsetek (tj. 53,8%) MDR szczepów *Salmonella*, które wykazały oporność na β -laktamy, aminoglikozydy, cefalosporyny, fluorochinolony, sulfonamidy i tetracykliny. Według najnowszego raportu EFSA i ECDC [196], w latach 2020–2021 w UE wśród szczepów odzwierzęcych oraz izolowanych od hospitalizowanych pacjentów odnotowano wysoki odsetek *Salmonella* opornych na ampicylinę, sulfonamidy i tetracykliny, natomiast oporność na cefalosporyny III generacji występowała na ogólnie bardzo niskim poziomie zarówno w przypadku cefotaksymu, jak i ceftazydymu. Szczepy *Salmonella* izolowane od pacjentów wykazywały umiarkowaną oporność na ciprofloksacyne. Wśród izolatów odzwierzęcych obserwowano z kolei bardzo wysoki odsetek szczepów opornych na fluorochinolony (ciprofloksacyne i kwas nalidyksowy). Na podstawie badań opisanych w **publikacji [P4]** stwierdzono, że żaden ze szczepów pochodzących od pacjentów hospitalizowanych nie wykazał oporności na ampicylinę i sulfonamidy, natomiast szczepy *S. enterica* KKP 996 i KKP 1193 wykazały genotypową oporność na tetracykliny (**Tabela 8**). Wśród izolatów odzwierzęcych obserwowano niski odsetek szczepów opornych na fluorochinolony. Podobnie jak w przypadku danych zebranych w raporcie EFSA/ECDC, oporność na cefotaksym, ceftriakson i ceftazydym nie występowała często (odpowiednio 7,6%, 26,4% i 5,7%) (**publikacja [P4]**, **Tabela 7**). Na podstawie przeprowadzonych badań potwierdzono, że żywność jest częstym źródłem wielolekoopornych bakterii chorobotwórczych (47,4% (18/38) MDR szczepów z produktów spożywczych i 55,6% (5/9) MDR szczepów odzwierzęcych lub wyizolowanych z pomieszczeń hodowli zwierząt).

W kolejnym etapie badań (**publikacja [P4]**) określono genotypowy profil oporności dla panelu szczepów *Salmonella* przy użyciu 25 par starterów. Szczepy *Salmonella* należące do jednego klonu w PFGE (**Rysunek 1**) nie wykazały identycznych profili oporności genotypowej (**Tabela 8**). W żadnym ze szczepów nie zidentyfikowano genów *aadB* i *aacC* kodujących oporność na gentamycynę (antybiotyk aminoglikozydowy). Nie stwierdzono także obecności genów *mcr1*,

mcr2, *mcr3*, *mcr4* i *mcr5* kodujących oporność na kolistynę, należącej do antybiotyków peptydowych, oraz genów *dfrA1*, *dfrA10* i *dfrA12* związanych z opornością na trimetoprim. W 7 (tj. 13,2%) izolatach potwierdzono obecność genu *floR*, ale w żadnym z badanych szczepów nie stwierdzono obecności genów *cat1* i *cat2*, które kodują oporność na chloramfenikol. Fenotypową oporność na ten antybiotyk potwierdzono jedynie u trzech szczepów *Salmonella* – tj. KKP 999, KKP 1000 i KKP 3820 (**Tabela 8**). Spośród dwóch badanych genów związanych z opornością na neomycynę (antybiotyk aminoglikozydowy), gen *aphA1* występował tylko w jednym (tj. 1,9%) szczepie *Salmonella* (tj. KKP 998), natomiast genu *aphA2* nie wykryto w żadnym z izolatów. Określono również obecność genów kodujących oporność na sulfametoksazol i spośród trzech badanych genów (tj. *sul1*, *sul2* i *sul3*) w żadnym ze szczepów nie potwierdzono genu *sul3*. Ponadto w siedmiu szczepach *Salmonella* (tj. KKP 1003, KKP 1040, KKP 1113, KKP 1611, KKP 1775, KKP 3816 i 3821) nie zidentyfikowano żadnego z badanych genów oporności. Co więcej, fenotypowy profil oporności szczepu *S. enterica* KKP 1040 nie został potwierdzony poprzez detekcję badanych genów oporności. Najwyższy odsetek szczepów opornych zaobserwowano w przypadku genotypowego badania oporności na tetracykliny, gdzie 10 (tj. 18,9%), 23 (tj. 43,4%) i 31 (tj. 58,5%) szczepów *Salmonella* posiadało odpowiednio geny *tetA*, *tetB* i *tetC* (**Tabela 9**). Wysoki odsetek szczepów *Salmonella* opornych na tetracykliny jest zgodny z danymi z raportu EFSA i ECDC [196] z 2023 r. W stosunkowo wysokim odsetku (tj. 35,8%) szczepów *Salmonella* potwierdzono obecność genu *sul1*, kodującego oporność na sulfametoksazol, z kolei tylko dwa (3,8%) szczepy *Salmonella* wykazały fenotypową oporność na sulfametoksazol z inhibitorem (tj. trimetoprimem) (**Tabela 7**).

W ostatnim etapie badań (**publikacja [P4]**) sprawdzono (fenotypowo i genotypowo) obecność głównych mechanizmów oporności na β -laktamy. U pałeczek z rodzaju *Salmonella*, podobnie jak u innych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, głównym mechanizmem oporności na antybiotyki β -laktamowe są β -laktamazy kodowane przez geny *bla* [195,197,198]. U *Salmonella* dominują β -laktamazy typu TEM, CTX-M i SHV [197], należące do grupy enzymów ESBL, które inaktywują cefalosporyny oraz penicyliny I, II i III generacji [195,197], ale nie działają z kolei wobec karbapenemów [199]. Wśród badanych szczepów nie zidentyfikowano mechanizmów ESBL typu TEM i CTX-M. Mechanizm ESBL typu SHV zidentyfikowano w dwóch izolatach, tj. *S. enterica* KKP 1597 i KKP 1610 wyizolowanych z produktów spożywczych (**Tabela 4**). Nie potwierdzono jednak fenotypowo obecności mechanizmów ESBL, co wskazuje, że prawdopodobnie gen *bla_{SHV}* (związany z ESBL typu SHV) u szczepów *S. enterica* KKP 1597 i KKP 1610 był nieaktywny. Inną grupą β -laktamaz jest AmpC, która nadaje oporność na wszystkie antybiotyki β -laktamowe z wyjątkiem cefalosporyn

IV generacji i karbapenemów [200,201]. W przeciwieństwie do ESBL, AmpC nie jest wrażliwa na inhibitory β -laktamowe, takie jak kwas klawulanowy, sulbaktam i tazobaktam [200]. Mechanizm AmpC może być kodowany przez geny zlokalizowane na chromosomach lub w plazmidach [201]. Wykazano, że w przypadku *Salmonella* oporność na cefalosporyny o szerokim spektrum działania jest często powiązana z genem *bla_{CMY-2}* [202]. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że żaden ze szczepów nie wykazał mechanizmu oporności na β -laktamazy typu AmpC. Kolejnym genem kodującym oporność na antybiotyki β -laktamowe jest *bla_{PSE-1}* zlokalizowany w integracie klasy I [195,198], który wiąże się z mechanizmem wyrzutu leku PSE-1. Jego obecność potwierdzono w sześciu szczepach *Salmonella* (tj. KKP 1000, KKP 1004, KKP 1005, KKP 1007 wyizolowanych z produktów spożywczych oraz KKP 3819 i KKP 3820 wyizolowanych od drobiu). Wśród badanych izolatów nie wykryto szczepów *Salmonella* wytwarzających karbapenemazy. Według raportu EFSA i ECDC odsetek szczepów *Salmonella* wytwarzających ESBL i AmpC w latach 2020–2021 wahał się od bardzo niskiego do niskiego (izolaty odzwierzęce) i bardzo niskiego wśród izolatów uzyskanych od hospitalizowanych pacjentów. W latach 2020–2021 nie wykryto żadnych izolatów *Salmonella* wytwarzających karbapenemazy [196]. Wyniki niniejszego raportu są porównywalne z wynikami uzyskanymi w wyniku realizacji zadań badawczych w **publikacji [P4]** i potwierdzają bardzo niski odsetek szczepów *Salmonella* wykazujących takie mechanizmy oporności.

Fenotypową oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe określono również wobec panelu szczepów bakterii saprofitycznych (**publikacja [P2]**). Spośród badanych szczepów siedemnaście (tj. 39,5%) nie wykazało fenotypowej oporności na żaden z testowanych antybiotyków. Wszystkie z badanych szczepów były wrażliwe na piperacylinę, piperacylinę z tazobaktamem i tikarcylinę z kwasem klawulanowym (penicyliny); cefotaksym i ceftazydym/awibaktam (cefalosporyny); wszystkie badane karbapenemy (tj. ertapenem, imipenem, meropenem); aztreonam (monobaktamy); lewofloksacynę (fluorochinolony); chloramfenikol (fenikole); i sulfametoksazol/trimetoprim (sulfonamidy). Większość szczepów bakterii wykazała wskaźnik MAR poniżej 0,3 z wyjątkiem trzech izolatów (tj. *Rahnella aquatilis* KKP 1383 (indeks MAR = 0,36) oraz *Serratia marcescens* KKP 585 (indeks MAR = 0,32) wyizolowanych z mieszanki sałat z burakiem oraz *Pantoea agglomerans* KKP 590 (indeks MAR = 0,32) wyizolowanej z mieszanki sałat z marchewką. Wśród szczepów bakterii saprofitycznych zaobserwowano niską częstość występowania MAR, a 18,6% (tj. 8/43) izolatów było MDR.

Szczep *Rahnella aquatilis* KKP 1383 wykazał najszerszy profil oporności na 10 antybiotyków należących do 4 różnych klas antybiotyków (tj. penicyliny,

cefalosporyny, fluorochinolony, i aminoglikozydy). Szerokie profile oporności wykazały także szczepy *Serratia marcescens* KKP 585 i *Pantoea agglomerans* KKP 590, które były odporne na 9 środków przeciwdrobnoustrojowych z 4 różnych klas antybiotyków (tj. penicyliny, cefalosporyny, fluorochinolony i aminoglikozydy). Szczepy *Enterobacter cloacae* KKP 575, KKP 3684, KKP 3686, KKP 3692 i KKP 3706; *Enterobacter* sp. KKP 3892; oraz *Serratia marcescens* KKP 585 i KKP 671 wykazały pełen wzrost z krążkami ampicyliny. Oporność tych szczepów wynika z faktu, iż bakterie z gatunków *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* oraz *Serratia marcescens* cechuje naturalna oporność na ampicylinę oraz amoksycylinę z kwasem klawulanowym (Tabela 1 w **podrozdziale 2.2.3** oraz [203]). Pomimo tego, szczepy *Citrobacter freundii* KKP 3655 oraz *Serratia marcescens* KKP 357 nie wykazały oporności na ampicylinę, z kolei szczep *Serratia marcescens* KKP 3687 był wrażliwy zarówno na ampicylinę, jak również amoksycylinę z kwasem klawulanowym. Oporność naturalna, w przeciwieństwie do oporności nabytej i/lub mutacyjnej, jest cechą charakterystyczną dla wszystkich lub niemal wszystkich izolatów w obrębie danego gatunku bakterii. Oporność naturalna na dany chemioterapeutyk oznacza, że jego aktywność przeciwbakteryjna z klinicznego punktu widzenia jest niewystarczająca lub oporność na dany lek jest wrodzona, co powoduje, że jest on klinicznie bezużyteczny. Oznaczenie wrażliwości szczepu bakterii należącej do gatunku z opornością naturalną należy traktować z ostrożnością, gdyż wynik ten oznacza najprawdopodobniej błąd w identyfikacji taksonomicznej szczepu lub nieprawidłowe oznaczenie lekowrażliwości. Pomimo potwierdzenia wrażliwości szczepu na chemioterapeutyk, zgodnie z rekomendacjami, należy unikać stosowania takiego leku w praktyce klinicznej. Co więcej, w niektórych przypadkach oporność naturalna na dany chemioterapeutyk może być wyrażana na niskim poziomie, z wartościami minimalnego stężenia hamującego (MIC) zbliżonymi do wartości granicznych dla kategorii „wrażliwy”, jednak lek ten uznaje się wówczas za klinicznie nieaktywny. Zdarzają się także przypadki, kiedy lek jest w pełni aktywny w warunkach *in vitro*, ale nie wykazuje skutecznego działania w warunkach *in vivo* [203].

Pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* wykazują także naturalną oporność na penicylinę benzyłową, glikopeptydy, kwas fusydowy, makrolidy (z pewnymi wyjątkami, tj. azytromycyna wykazuje skuteczność *in vivo* w leczeniu duru brzuszego, zaś erytromycyna może być stosowana do leczenia biegunki podróżnych), linkozamidy, streptograminy, rifampicynę, daptomycynę oraz linezolid. Co więcej, wszystkie pałeczki z gatunku *Serratia marcescens* produkują chromosomalny enzym AAC(6')-Ic, który ogranicza (ale nie całkowicie) aktywność wszystkich dostępnych klinicznie aminoglikozydów, z wyjątkiem streptomycyny, gentamicyny i arbekacyny [203]. Zgodnie z wynikami

przedstawionymi w **publikacji [P2]**, szczep *Serratia marcescens* KKP 585 był oporny na wszystkie badane antybiotyki z klasy aminoglikozydów (tj. amikacynę, gentamycynę i tobramycynę) (**Tabela 3**). Szczepy bakterii saprofitycznych wykazały najwyższą oporność na antybiotyki z klasy penicylin i cefalosporyn (**Tabela 4**). Dwadzieścia (tj. 46,5%) szczepów wykazało oporność na ampicylinę (penicyliny), a piętnaście (tj. 34,9%) szczepów było opornych na amoksycylinę z kwasem klawulanowym (penicyliny) oraz ceftarolinę (cefalosporyna V generacji).

Oporność na antybiotyki wśród bakterii chorobotwórczych z rodziny *Enterobacteriaceae* izolowanych z produktów spożywczych jest przedmiotem zainteresowań wielu zespołów badawczych, jednak brak jest wystarczającej liczby doniesień dotyczących profili oporności bakterii saprofitycznych wyizolowanych z minimalnie przetworzonej żywności pochodzenia roślinnego. W badaniu Richtera i wsp. [204] określono profile oporności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* wyizolowanych ze świeżych warzyw. Analiza fenotypowej oporności na antybiotyki wykazała, że 96,1% z 77 badanych izolatów była MDR, a oporność najczęściej dotyczyła aminoglikozydów (94,8%), chloramfenikolu (85,7%) oraz tetracykliny (53,2%). Vincenti i wsp. [205] określili oporność na antybiotyki w żywności gotowej do spożycia w stołówkach szpitalnych i publicznych w Rzymie. Badania wykazały, że około 38% żywności nie spełniała kryteriów mikrobiologicznych bezpieczeństwa żywności i mogła stanowić realne zagrożenie dla zdrowia konsumentów ze względu na rozprzestrzenianie szczepów antybiotykoopornych.

W wyniku przeprowadzonych badań (**publikacja [P2]**) nie zidentyfikowano żadnych szczepów bakterii saprofitycznych o fenotypowej aktywacji mechanizmów oporności na antybiotyki typu ESBL czy karbapenemazy. Z kolei w badaniu Richtera i wsp. [204] fenotypy oporności typu ESBL wykazano aż u 79,2% spośród badanych szczepów.

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych badań wykazano wysoki odsetek MDR szczepów *Salmonella* (tj. 50,9%; **publikacja [P4]**), z kolei wyizolowane szczepy bakterii saprofitycznych nie wykazały wysokiego wskaźnika oporności wielolekowej (tj. 18,6%; **publikacja [P2]**), jednak ze względu na ryzyko przenoszenia ARGs w środowisku, sytuacja ta powinna podlegać monitoringowi.

Poprzez zrealizowanie zadań badawczych 1 oraz 2 potwierdzono hipotezę [H1]: Gram-ujemne bakterie występujące w łańcuchu żywnościowym cechuje nabyta oporność na powszechnie stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe, co decyduje o ich znacznym udziale w transferze antybiotykooporności w środowisku żywności.

5.3. Określenie aktywności wyizolowanych bakteriofagów oraz zakresu bakteryjnych gospodarzy

Druga część badań koncentrowała się na poszukiwaniu i charakterystyce bakteriofagów ukierunkowanych wobec dominującej mikrobioty bakteryjnej wyizolowanej z łańcucha żywnościowego. W **publikacji [P2]** scharakteryzowano bakteriofagi specyficzne wobec 43 bakterii saprofitycznych pochodzących z żywności minimalnie przetworzonej pochodzenia roślinnego. W **Tabeli 5.** przedstawiono wszystkich bakteryjnych gospodarzy dla fagów, miana poszczególnych lizatów fagowych, wygląd tworzonych przez nie łąsinek (tj. klarowne ze strefą *halo*, klarowne bez strefy *halo* lub mętne) oraz uśrednione wyniki zmian gęstości optycznej mikrohodowli bakterii z bakteriofagami przy współczynnikach infekcji MOI = 1,0 lub MOI = 0,1. Dla każdego ze szczepów bakteryjnych gospodarzy obliczono współczynnik właściwej szybkości wzrostu (μ). Niższe wartości współczynników μ wyznaczone dla mikrohodowli zainfekowanych fagami wskazują na znaczną supresję podziałów komórek podczas logarytmicznej fazy wzrostu badanych szczepów bakterii. Przy MOI = 1,0 zaobserwowano silniejsze zahamowanie podziałów komórkowych bakterii w stosunku do niższego współczynnika infekcji (tj. MOI = 0,1) (**publikacja [P2]**, **Tabela 5**). Cztery z badanych fagów (tj. Enterobacter phage KKP 3262 (vB_Ecl-IAFB3262) wobec *Enterobacter cloacae* KKP 3082, Enterobacter phage KKP 3263 (vB_Elu-IAFB3263) wobec *Enterobacter ludwigii* KKP 3083, Serratia phage KKP 3264 (vB_Sfo-IAFB3264) wobec *Serratia fonticola* KKP 3084 oraz Citrobacter phage KKP 3664 (vB_Cfr-IAFB3664) wobec *Citrobacter freundii* KKP 3655) kompleksowo scharakteryzowano w **publikacji [P1]**, a kinetykę wzrostu ich bakteryjnych gospodarzy przedstawiono na **Rysunku 2 (publikacja [P1])**.

Dla czterech powyższych bakteriofagów określono spektrum lityczne (dane nieopublikowane w publikacjach; wyniki przedstawiono w **Tabeli 2.** poniżej). Spośród badanych bakteriofagów, Serratia phage KKP 3264 cechował najszerszy zakres bakteryjnych gospodarzy. Citrobacter phage KKP 3664 natomiast wykazał aktywność jedynie wobec swojego gospodarza.

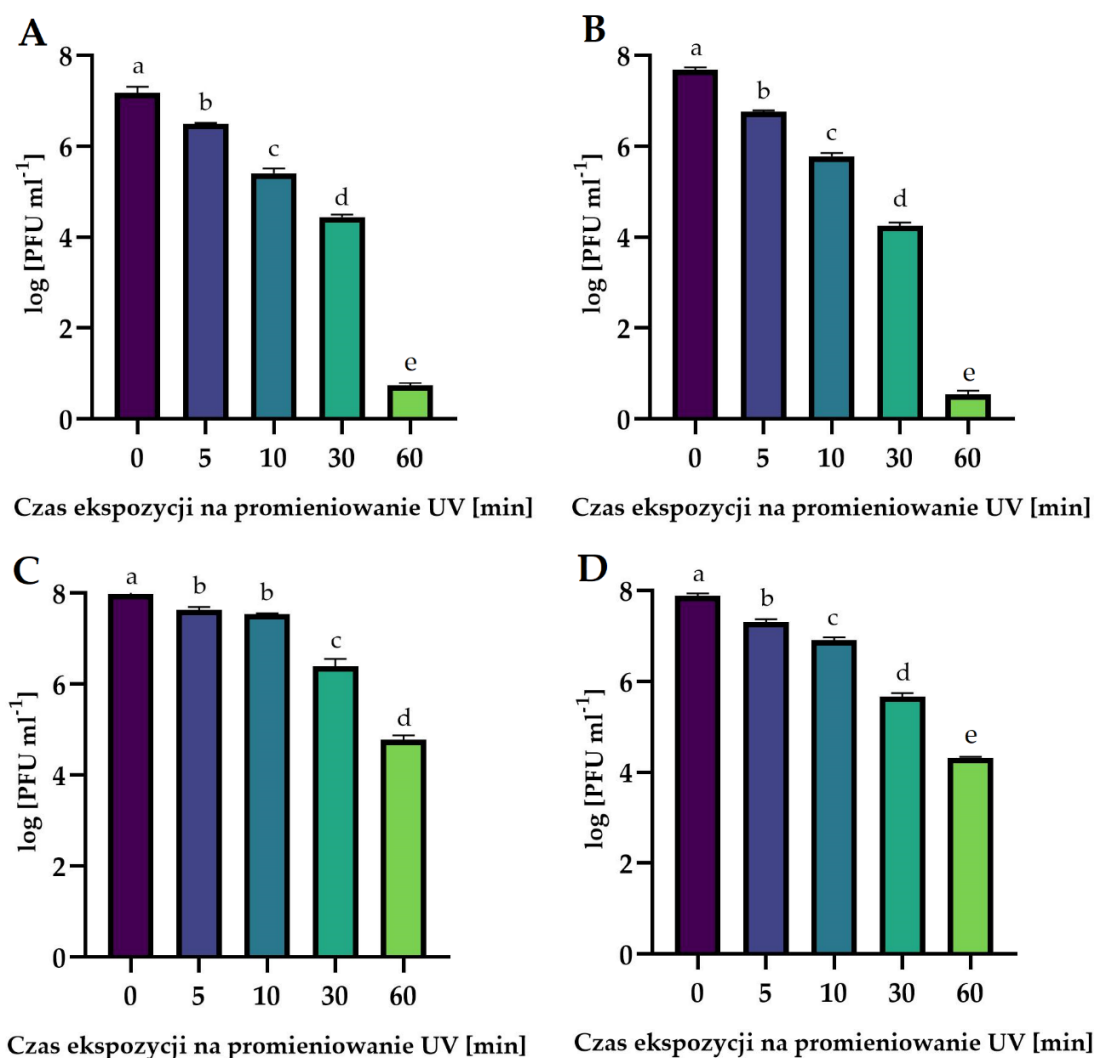
Tabela 2. Zakres bakteryjnych gospodarzy dla fagów wyizolowanych wobec bakterii saprofitycznych.

Szczep bakteryjnego gospodarza ($n = 25$)	Numer akcesyjny w bazie danych GenBank	Testowany bakteriofag			
		KKP 3262 vB_Ecl-IAFB3262	KKP 3263 vB_Elu-IAFB3263	KKP 3264 vB_Sfo-IAFB3264	KKP 3664 vB_Cfr-IAFB3664
<i>Enterobacter cloacae</i> KKP 3082	MZ827006	++ ^H	–	++	–
<i>Enterobacter ludwigii</i> KKP 3083	MZ827002	–	++ ^H	+	–

<i>Serratia fonticola</i> KKP 3084	MZ827668	-	-	++ ^H	-
<i>Citrobacter freundii</i> KKP 3655	MZ827001	+	-	+	++ ^H
<i>Enterobacter cloacae</i> KKP 3656	OM304355	++	-	++	-
<i>Enterobacter cloacae</i> KKP 3684	OM281790	++	-	++	-
<i>Enterobacter cloacae</i> KKP 3686	OM281778	++	-	++	-
<i>Enterobacter cloacae</i> KKP 3692	OM281803	++	-	++	-
<i>Enterobacter cloacae</i> KKP 3706	OM278533	++	-	++	-
<i>Escherichia coli</i> KKP 3650	OM287487	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> KKP 3688	OM281784	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> KKP 3691	OM281773	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> KKP 3705	OM212647	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> KKP 3707	OM281777	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> KKP 3800	OM250392	-	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> KKP 3801	OM250391	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> KKP 3802	OM250393	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> KKP 3824	ON303636	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> KKP 3825	ON303626	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i> KKP 3651	OP978292	-	-	+	-
<i>Raoultella terrigena</i> KKP 3689	OK085529	-	-	-	-
<i>Serratia fonticola</i> KKP 3652	OM287486	-	-	-	-
<i>Serratia fonticola</i> KKP 3685	OM281802	-	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i> KKP 3654	OP978313	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> KKP 3687	OK103977	-	-	-	-

Oznaczenia w tabeli: „H” – szczep bakteryjnego gospodarza, wobec którego pierwotnie wyizolowano bakteriofaga (ang. *host strain*); „++” – przezroczyste/klarowne łyśinki; „+” – mętne/nieklarowne łyśinki; „-” – brak łyśinek (bakteria niewrażliwa na badanego faga). Każdy test punktowy wykonano w trzech powtórzeniach ($n = 3$).

Następnie zbadano wpływ czynników środowiskowych na aktywność fagów. W badaniach przedstawionych w **publikacji [P1]** określono wpływ temperatury oraz kwasowości czynnej (pH) na zachowanie aktywności czterech bakteriofagów. W zależności od bakteriofaga, zachowały one swoją aktywność w zakresie temperatur od -20°C do 50°C oraz kwasowości czynnej w zakresie pH od 4 do 11. Wyższe temperatury (60°C i więcej) oraz skrajne wartości pH (3 oraz 12) ograniczyły lub całkowicie zahamowały aktywność fagów, prawdopodobnie w wyniku denaturacji białek wirionów. Określono również wpływ naświetlania promieniami UV na aktywność bakteriofagów (dane nieopublikowane w publikacjach; wyniki przedstawiono na **Rysunku 7**. poniżej). Czas ekspozycji na promieniowanie UV istotnie wpływał na ograniczenie aktywności bakteriofagów, proporcjonalnie do czasu naświetlania.



Rysunek 7. Aktywność fagów wobec szczepów bakteryjnych gospodarzy po różnym czasie ekspozycji na promieniowanie UV: (A) – Enterobacter phage KKP 3262 (vB_Ecl-IAFB3262); (B) – Enterobacter phage KKP 3263 (vB_Elu-IAFB3263); (C) – Serratia phage KKP 3264 (vB_Sfo-IAFB3264); (D) – Citrobacter phage KKP 3664 (vB_Cfr-IAFB3664). Litery a, b, c, d oraz e oznaczają grupy jednorodnie przy poziomie istotności $p \leq 0,05$, $n = 3$.

W badaniach zaprezentowanych w **publikacji [P5]** wyizolowano specyficzne bakteriofagi wobec dwóch MDR szczepów *Salmonella*: tj. Salmonella phage KKP 3829 (vB_Sen-IAFB3829) wobec S.I (6,8:1,-:1,7) KKP 1762 oraz Salmonella phage KKP 3830 (vB_Sen-IAFB3830) wobec *S. Typhimurium* KKP 3080. W pierwszej kolejności określono spektrum lityczne nowo wyizolowanych bakteriofagów (**Tabela 3**). W większości przypadków zaobserwowano mętne strefy zahamowania wzrostu bakterii. Salmonella phage KKP 3829 wykazał szeroki zakres aktywności, infekując 92,6% (tj. 50/54) szczepów *Salmonella*. Ponadto wykazał aktywność wobec trzech szczepów bakterii z gatunku *Enterobacter cloacae* i trzech z gatunku *Escherichia coli*. Drugi z bakteriofagów, Salmonella phage KKP 3830, wykazał znacznie węższy zakres aktywności, infekując 44,4% (tj. 24/54) szczepów *Salmonella*. Co więcej, nie wykazał aktywności wobec innych niepatogennych przedstawicieli bakterii z rzędu *Enterobacterales*. Żaden z wyizolowanych bakteriofagów nie wykazał aktywności wobec czterech szczepów z rodzaju *Salmonella*, tj. *S. Derby* KKP 1006, *S. enterica* KKP 1113, *S. Mbandaka* KKP 1169 oraz *S. Senftenberg* KKP 1597. Fagi nie wykazały aktywności wobec żadnej z testowanych bakterii z rodzajów *Citrobacter*, *Pantoea*, *Raoultella* oraz *Serratia*. Bakterie chorobotwórcze inne niż *Salmonella*, zarówno Gram-ujemne (*P. aeruginosa*), jak i Gram-dodatnie (*L. monocytogenes*, *S. aureus*) nie wykazały wrażliwości na nowo wyizolowane fagi. Ocena spektrum litycznego fagów jest ważnym krokiem podczas charakterystyki bakteriofagów, które są potencjalnymi kandydatami do zastosowania w biopreparacie [206,207]. Koktajle fagowe przeznaczone do terapii fagowej powstają zazwyczaj poprzez połączenie kilku znanych lub nowo wyizolowanych fagów celem opracowania mieszaniny terapeutycznej o możliwie szerokiej specyficzności gospodarza [206–209]. Szerokospektralne koktajle fagowe mogą stanowić alternatywę wobec antybiotyków o szerokim spektrum działania [210,211]. Pomimo pokrywającego się zakresu gospodarzy dla dwóch nowo wyizolowanych bakteriofagów, włączenie ich obu w skład biopreparatu fagowego może zapewnić większą bioróżnorodność i poprawić jego efektywność m.in. w przypadku, gdy gospodarz wykształcił oporność na jednego z fagów.

Aby określić charakterystykę wzrostu fagów, wyznaczono jednoetapowe krzywe wzrostu (**Rysunek 4**). W przypadku obu fagów, ich okres latencji wyniósł 20 minut, zaś czas wyrzutu trwał od 55 minut (*Salmonella* phage KKP 3830) do 65 minut (*Salmonella* phage KKP 3829). Obliczona wielkość wyrzutu wyniosła od 11 ± 1 PFU komórka⁻¹ (*Salmonella* phage KKP 3830) do 22 ± 0 PFU komórka⁻¹ (*Salmonella* phage KKP 3829) (**Tabela 4**). Zarówno okres latencji, jak również wielkość wyrzutu są kluczowymi parametrami przy rozważaniu, czy danego bakteriofaga można typować jako czynnik biokontroli [212]. Wykazano, że duża wielkość wyrzutu i krótki okres latencji są dodatnio skorelowane ze skuteczną

inaktywacją bakterii [213]. Badanie adsorpcji fagów wykazało, że każdy z nich adsorbował inaczej do komórek bakteryjnych gospodarzy (**Rysunek 5**). Po 5 minutach inkubacji poziomy adsorpcji wyniosły średnio 30,0% i 21,1% odpowiednio dla Salmonella phage KKP 3829 i Salmonella phage KKP 3830. Pod koniec eksperymentu (20 min) oba fagi istotnie zwiększyły liczbę cząstek zaadsorbowanych na powierzchni komórek gospodarza. Wyznaczone stałe szybkości adsorpcji k wyniosły od $1,15 \times 10^9$ ml min⁻¹ (Salmonella phage KKP 3830) do $2,69 \times 10^9$ ml min⁻¹ (Salmonella phage KKP 3829). Stała szybkości adsorpcji k była skorelowana z wyznaczonymi eksperymentalnie współczynnikami adsorpcji – fag o wyższej wartości parametru k (tj. Salmonella phage KKP 3829) osiągnął wysoki współczynnik adsorpcji (> 70%) pod koniec eksperymentu (20 min) (**Tabela 5**).

W kolejnym etapie wyznaczono kinetykę wzrostu dla bakteryjnych gospodarzy. Dla fagów specyficznych wobec bakterii patogennych zastosowano szeroki zakres współczynników infekcji (tj. MOI = 1000; MOI = 100 ; MOI = 10; MOI = 1,0; MOI = 0,1; MOI = 0,01; MOI = 0,001; i MOI = 0,0001). W zależności od zastosowanego MOI, fagi w różnym stopniu zahamowały wzrost bakteryjnych gospodarzy (**Rysunek 6** oraz **Tabela 6**). W przypadku obu szczepów *Salmonella*, infekcja specyficznym fagiem w każdym MOI spowodowała istotne obniżenie ($p < 0,0001$) gęstości optycznej mikrohodowli w porównaniu z mikrohodowlą kontrolną. Podobnie jak w przypadku fagów wobec bakterii saprofitycznych, niższe wartości współczynników μ wyznaczone dla mikrohodowli zainfekowanych fagami wskazują na silniejszą supresję podziałów komórek podczas logarytmicznej fazy wzrostu badanych szczepów *Salmonella*.

Oba fagi zachowywały swoją aktywność w szerokim zakresie temperatur (od – 20°C do 60°C; **Rysunek 13**) i kwasowości czynnej (pH w zakresie od 3 do 11; **Rysunek 14**). Ekspozycja fagów na promieniowanie UV istotnie zmniejszyła ich aktywność proporcjonalnie do czasu tej ekspozycji (**Rysunek 15**). Co ważne, promieniowanie UV w żadnym przypadku nie spowodowało całkowitej inaktywacji cząstek fagowych.

5.4. Analiza morfologiczna i charakterystyka genomiczna wytypowanych bakteriofagów

Wyizolowane bakteriofagi zwizualizowano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Fagi specyficzne wobec bakterii saprofitycznych (**publikacja [P1]**, **Rysunek 3**) wykazały morfotyp miowirusów (tj. Enterobacter phage KKP 3262, Serratia phage KKP 3264 oraz Citrobacter phage KKP 3664), charakteryzujący fagi o budowie złożonej z długim, kurczliwym ogonkiem, lub morfotyp podowirusów (tj. Enterobacter phage KKP 3263), który charakteryzuje fagi o budowie złożonej

z krótkim, niekurczliwym ogonkiem. Oba bakteriofagi wyizolowane wobec pałeczek z rodzaju *Salmonella* (tj. *Salmonella* phage KKP 3829 oraz *Salmonella* phage KKP 3830) charakteryzuje morfotyp sifowirusów, czyli fagów o budowie złożonej z długim, niekurczliwym ogonkiem (**publikacja [P5], Rysunek 7**).

W kolejnym etapie z, wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania w aplikacji WGS oraz asemblacji *de novo*, określono sekwencje pełnych genomów wszystkich nowo wyizolowanych bakteriofagów. Na podstawie złożonych genomów fagów wygenerowano drzewa proteomiczne (odpowiednio dla fagów wobec bakterii saprofitycznych: **publikacja [P1], Rysunek 5**; oraz dla fagów wobec *Salmonella*: **publikacja [P5], Rysunek 8**) oraz mapy organizacji genomów (dla fagów wobec bakterii saprofitycznych: **publikacja [P1], Rysunki 6, 8, 10 i 12**; oraz dla fagów wobec *Salmonella*: **publikacja [P5], Rysunki 9 i 11**). Analiza genomyczna wykazała, że wszystkie bakteriofagi reprezentują fagi ogoniaste zaliczane do klasy *Caudoviricetes* o strukturze genomu w postaci liniowego dsDNA. Na podstawie predykcji sekwencji nukleotydowych z rekordami zdeponowanymi w bazie NCBI, moduły funkcjonalne obecne w genomach fagów powiązано ze: a) strukturą/złożeniem faga, b) replikacją/modyfikacją/regulacją DNA, c) lizą faga oraz d) pakowaniem DNA do kapsydu. W genomach *Enterobacter* phage KKP 3263, *Citrobacter* phage KKP 3664, *Salmonella* phage KKP 3829 oraz *Salmonella* phage KKP 3830 nie zidentyfikowano potencjalnych genów tRNA, co sugeruje, że fagi te wykorzystują tRNA swojego gospodarza do syntezy własnych białek. Brak genów tRNA może wynikać ze skompresowanej struktury genomów fagów, u których nie identyfikuje się sekwencji genów związanych z translacją, co może być powiązane z wykluczeniem nieistotnych informacji podczas replikacji [214]. W genomach fagów nie zidentyfikowano genów oporności na antybiotyki, genów kodujących czynniki wirulencji, integrazy, rekombinazy oraz represorów, które są markerami bakteriofagów umiarkowanych. Celem oceny stopnia homologii, genomy bakteriofagów porównano z genomami bakteriofagów zdeponowanych w międzynarodowej bazie danych GenBank (**publikacja [P1], Rysunki 7, 9, 11 i 13** oraz **publikacja [P5], Rysunki 10 i 12**). Genomy fagów wobec bakterii saprofitycznych zdeponowano pod numerami akcesyjnymi OK210076, OK210074, OK210077 oraz OK210075 odpowiednio dla *Enterobacter* phage KKP 3262, *Enterobacter* phage KKP 3263, *Serratia* phage KKP 3264 oraz *Citrobacter* phage KKP 3664. W związku z nowym raportem BVS (z 2023 r.), w **Tabeli 3** przedstawiono zaktualizowaną klasyfikację taksonomiczną bakteriofagów wyizolowanych wobec bakterii saprofitycznych.

Tabela 3. Aktualnie obowiązująca klasyfikacja taksonomiczna fagów wyizolowanych wobec bakterii saprofitycznych.

Bakteriofag	Przynależność taksonomiczna wg publikacji [P1] (rząd / rodzina)	Aktualna klasyfikacja taksonomiczna wg najnowszego raportu BVS (klasa / rodzina / podrodzina / rodzaj)
KKP 3262 vB_Ecl-IAFB3262	<i>Caudovirales</i> / <i>Myoviridae</i>	<i>Caudoviricetes</i> / <i>Straboviridae</i> / <i>Tevenvirinae</i> / <i>Karamvirus</i>
KKP 3263 vB_Elu-IAFB3263	<i>Caudovirales</i> / <i>Autographiviridae</i>	<i>Caudoviricetes</i> / <i>Autographiviridae</i> / <i>Studiervirinae</i> / <i>Kayfunavirus</i>
KKP 3264 vB_Sfo-IAFB3264	<i>Caudovirales</i> / <i>Myoviridae</i>	<i>Caudoviricetes</i> / – / <i>Stephanstirmvirinae</i> / <i>Justusliebigvirus</i>
KKP 3664 vB_Cfr-IAFB3664	<i>Caudovirales</i> / <i>Myoviridae</i>	<i>Caudoviricetes</i> / <i>Straboviridae</i> / – / <i>Pseudotevenvirus</i>

„–” oznacza brak sklasyfikowania w obrębie rodziny / podrodziny

Genomy salmofagów zdeponowano pod numerami akcesyjnymi OQ674105 dla *Salmonella* phage KKP 3829 oraz OQ674106 dla *Salmonella* phage KKP 3830.

5.5. Ocena skuteczności koktajlu bakteriofagowego w poprawie jakości mikrobiologicznej wybranych minimalnie przetworzonych matryc żywnościowych

Ostatnie zadanie badawcze dotyczyło praktycznej aplikacji koktajlów fagowych do matryc żywnościowych. Oceniono skuteczność koktajlu fagowego (składającego się ze wszystkich 43 wyizolowanych bakteriofagów specyficznych wobec bakterii saprofitycznych) do redukcji ogólnej liczby bakterii (**publikacja [P2], Tabela 6**). Należy podkreślić, że wykorzystane fagi wyizolowano wobec bakteryjnych gospodarzy pochodzących z innych partii produkcyjnych produktów niż te, które zastosowano jako matryce żywnościowe. Ich skuteczne działanie było zatem możliwe tylko wtedy, jeśli w produkcie występowały te same szczepy bakterii, co w partiach produkcyjnych, z których wyizolowano czyste kultury gospodarzy, lub gdy fagi wykazywały szerokie spektrum lityczne wobec różnych gatunków (lub szczepów) bakterii. Zastosowany koktajl fagowy działał w różnym stopniu, w zależności od metody aplikacji i matrycy żywnościowej. Aplikacja koktajlu fagowego w rukoli zarówno w formie natrysku, jak i wkładki absorpcyjnej znacząco ograniczyła wzrost mikroorganizmów w środowisku produktu już po 6 h. Obie zastosowane metody aplikacji w podobny sposób ograniczyły wzrost bakterii, co doprowadziło do redukcji ogólnej liczby bakterii o 99% w porównaniu do prób kontrolnych. Zastosowanie koktajlu fagowego do mieszanki sałat z marchewką istotnie zredukowało poziom ogólnej liczby bakterii dopiero po 48 h, przy czym wkładka absorpcyjna ograniczyła wzrost bakterii w produkcie skuteczniej niż natrysk. Zastosowanie koktajlu fagowego w postaci

bezpośredniego natrysku lub wkładki absorpcyjnej zmniejszyło ogólną liczbę bakterii o 99,9% w porównaniu do prób kontrolnych. Podobny efekt zastosowania koktajlu fagowego zaobserwowano w mieszance sałat z burakiem, gdzie redukcja poziomu ogólnej liczby bakterii nastąpiła dopiero po 48 h. Co więcej, bezpośredni natrysk w porównaniu do wkładki absorpcyjnej skuteczniej ograniczył wzrost bakterii w produkcie. Niezależnie od metody aplikacji, po 48 h poziom ogólnej liczby bakterii był niższy o 99% w porównaniu do prób kontrolnych. W przypadku zastosowania koktajlu fagowego na szpinak myty oraz szpinak niemyty nie uzyskano redukcji ogólnej liczby bakterii. Prawdopodobnie wysoka aktywność wody wygenerowana podczas zastosowania natrysku i wkładki absorpcyjnej mogła spowodować wzrost innych bakterii związanych z produktem, wobec których fagi nie były ukierunkowane. Inną przyczyną, która doprowadziła do braku skuteczności koktajlu fagowego mogło być nabycie przez bakterie fagooporności lub lizogenizacja fagów w biopreparacie. Wreszcie, od strony składu biopreparatu mogła nastąpić konkurencja międzygatunkowa pomiędzy fagami, co doprowadziło do zmniejszenia lub braku efektywności koktajlu fagowego wobec mikrobioty bakteryjnej produktów.

Skuteczność czterofagowego koktajlu ukierunkowanego na eradykację pałeczek z rodzaju *Salmonella* określono w dwóch rodzajach soków minimalnie przetworzonych: marchwiowo-mango-jabłkowym utrwalanym HHP (przy 600 MPa) oraz surowym soku marchwiowo-jabłkowym (**publikacja [P5]**). Zastosowanie pojedynczego faga lub koktajlu fagowego do soku utrwalanego techniką HHP znacząco zmniejszyło liczbę pałeczek *Salmonella*. Wyjątkiem był *Salmonella* phage KKP 3830 zaaplikowany do soku zakażonego szczepem S.I (6,8:l,-:1,7) KKP 1762, w którym nie wykazano istotnej redukcji patogenu (**Rysunek 16** oraz **Tabela 8**). W tym przypadku poziom zanieczyszczenia pałeczkami S.I (6,8:l,-:1,7) KKP 1762 był zbliżony do prób kontrolnych, co było związane z brakiem aktywności *Salmonella* phage KKP 3830 wobec tego patogenu (**publikacja [P5]**, **Tabela 3**). Każdy z fagów zastosowanych indywidualnie w różnym stopniu ograniczał poziom zawartości patogenów. Wzrost patogenów został w najwyższym stopniu ograniczony przez faga, dla którego dany szczep bakteryjny był gospodarzem docelowym (tj. wzrost S.I (6,8:l,-:1,7) KKP 1762 był najsilniej hamowany przez *Salmonella* phage KKP 3829, z kolei wzrost *S. Typhimurium* KKP 3080 najsilniej hamował *Salmonella* phage KKP 3830). Najsilniejsze działanie hamujące wzrost pałeczek *Salmonella* uzyskano stosując koktajl złożony ze wszystkich czterech bakteriofagów. Liczba S.I (6,8:l,-:1,7) KKP 1762 w sokach traktowanych zarówno *Salmonella* phage KKP 3829, jak i czterofagowym koktajlem, pod koniec przechowywania w temperaturze chłodniczej (4°C), była na podobnym poziomie. Zastosowanie koktajlu fagowego zmniejszyło wzrost obu szczepów bakteryjnych patogenów pod koniec

przechowywania w temperaturze chłodniczej o około 90% w porównaniu z próbami kontrolnymi (nietraktowanymi fagami). Biorąc pod uwagę kwasowość czynną (pH) soków podczas siedmiodniowego przechowywania w temperaturze chłodniczej nie zaobserwowano istotnych zmian. Drugim badanym produktem był surowy sok marchwiowo-jabłkowy. Wpływ koktajlu fagowego na ograniczenie wzrostu liczby *Salmonella* określono zarówno podczas chłodniczego przechowywania (temp. 4°C), jak również w temp. 20°C (**publikacja [P5], Rysunek 17**). Dodatek czterofagowego koktajlu do soku zakażonego S.I (6,8:1,-:1,7) KKP 1762 i przechowywanego w temp. 4°C przez 24 h znacząco zmniejszył poziom bakterii patogennych. W przypadku *S. Typhimurium* KKP 3080 istotna redukcja nastąpiła z kolei po 48 h. W sokach zakażonych pałeczkami *Salmonella* i przechowywanych w temp. 20°C, po 24 h w sokach kontrolnych zaobserwowano wzrost pałeczek o rząd log w stosunku do liczby początkowej, co można wytłumaczyć możliwością wzrostu *Salmonella* w temp. 20°C. W sokach przechowywanych w temp. 20°C i traktowanych fagami, po 24 h zaobserwowano znaczącą redukcję pałeczek *Salmonella* w porównaniu z sokami kontrolnymi. Podczas dalszego przechowywania soków w temp. 20°C (2 dni i dłużej), podobnie jak w przypadku 7-dniowego przechowywania soku w temp. 4°C, zarówno w sokach kontrolnych, jak i traktowanych fagami, nie stwierdzono obecności pałeczek *Salmonella*. Zahamowanie wzrostu *Salmonella* mogło być spowodowane gwałtownymi zmianami pH matrycy żywnościowej (**Rysunek 17**; prawa strona wykresów). Zmiany pH wynikały prawdopodobnie z zastosowania jako matrycy żywnościowej soku surowego, który nie był produktem sterylnym i mógł zawierać szczepy autochtoniczne, m.in. bakterie silnie kwaszące. Pałeczki z rodzaju *Salmonella* mogą rozwijać się w zakresie pH 4–9, zatem obniżenie pH do wartości 3,9 i poniżej mogło zahamować ich wzrost.

Zastosowanie czterofagowego koktajlu różnych bakteriofagów nie zagwarantowało osiągnięcia całkowitej redukcji *Salmonella* w matrycach żywnościowych, ale znacząco zahamowało wzrost tych patogenów. Pomimo tego, że wzrost S.I (6,8:1,-:1,7) KKP 1762 w badaniu *in vitro* przy MOI = 1,0 został całkowicie zahamowany (**publikacja [P5], Rysunek 6**), takiego efektu nie uzyskano w badaniu *in vivo*. W przyszłości właściwym podejściem może być zastosowanie koktajlu fagów o wyższym mianie. Dodatkowo *Salmonella* phage KKP 3830 nie wykazał aktywności wobec szczepu S.I (6,8:1,-:1,7) KKP 1762 (**Tabela 3**), co skutkowało obniżeniem aktywności biopreparatu. Wreszcie na aktywność biopreparatu wpływało również pH matrycy żywnościowej. Badanie *in vitro* potwierdziło, że bakteriofagi były stabilne przez 1 h przy niskiej kwasowości czynnej (pH 3–4), ale nie przeprowadzono badań stabilności długoterminowej. Dalsze badania powinny być prowadzone równoległe, zarówno w sterylnych matrycach żywnościowych, jak również w żywności surowej

(nieutrwalonej) celowo zakażonej patogenami bakteryjnymi. Właściwym podejściem może być również próba zastosowania technologii płotków, gdzie jedną z metod utrwalania będzie biokontrola fagowa. Stosowany w sektorze spożywczym koktajl fagowy powinien zawierać szeroką gamę fagów tak dobranych, aby były skuteczne wobec wielu szczepów, gatunków i rodzajów bakterii, zarówno patogennych, jak i saprofitycznych, powszechnie występujących w danym typie produktów. Przede wszystkim musi gwarantować bezpieczeństwo zdrowotne konsumentów, a poprzez skuteczne hamowanie wzrostu bakterii w żywności wydłużać okres przydatności do spożycia.

Poprzez zrealizowanie zadań badawczych 3, 4 oraz 5 **potwierdzono hipotezę [H2]: bakteriofagi lityczne o szerokim zakresie bakteryjnych gospodarzy są skuteczną metodą biokontroli bakterii saprofitycznych i patogennych, w tym wielolekoopornych, w środowisku żywności.**

6. STWIERDZENIA I WNIOSKI

Głównym celem niniejszej pracy była ocena możliwości wykorzystania bakteriofagów litycznych w biokontroli żywności minimalnie przetworzonej pochodzenia roślinnego.

Do osiągnięcia celu głównego sformułowano dwie hipotezy badawcze, które w wyniku zaplanowanych i zrealizowanych pięciu celów szczegółowych – zadań badawczych zostały potwierdzone.

Na podstawie przeprowadzonych i omówionych badań zawartych w cyklu pięciu artykułów naukowych sformułowano następujące stwierdzenia i wnioski:

1. Wśród wyizolowanych i testowanych bakterii saprofitycznych, prawie 20% stanowiły szczepy wielolekooporne, co wskazuje na konieczność monitorowania przenoszenia antybiotykooporności w łańcuchu żywnościowym.
2. Pałeczki z rodzaju *Salmonella* wykazują fenotypową oporność na wiele antybiotyków (50,9% szczepów MDR) i kodują liczne geny związane z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe.
3. Duża liczba opornych szczepów *Salmonella* w połączeniu z wieloma ARGs potwierdza wieloletnie nieracjonalne stosowanie antybiotyków.
4. Ścieki komunalne są bogatym źródłem bakteriofagów litycznych specyficznych zarówno wobec bakterii saprofitycznych, jak również patogennych występujących w minimalnie przetworzonej żywności pochodzenia roślinnego.
5. Bakteriofagi zachowały swoją aktywność w szerokim zakresie temperatur i kwasowości czynnej, co może umożliwić w przyszłości ich wykorzystanie w połączeniu z konwencjonalnymi metodami utrwalania żywności (np. w technologii płatków). Ekspozycja fagów na promieniowanie UV zmniejszała ich aktywność proporcjonalnie do czasu tej ekspozycji.
6. Analiza genomów wszystkich nowo wyizolowanych bakteriofagów wykazała, że nie kodują one genów wirulencji ani toksyn i można je sklasyfikować jako bakteriofagi obligatoryjnie lityczne (wirulentne). Charakterystyka zjadliwości i brak możliwych czynników wirulencji sprawiają, że fagi te mogą w przyszłości być potencjalnymi kandydatami do biokontroli żywności.
7. Zastosowanie koktajlu fagowego skutecznie ograniczyło rozwój bakterii saprofitycznych w trzech testowanych produktach podczas przechowywania (tj. rukola, mieszanka sałat z marchewką oraz mieszanka

sałat z burakiem). Nie zaobserwowano pozytywnego wpływu zastosowanego koktajlu fagowego na redukcję liczby bakterii w szpinaku, co może świadczyć o niedostatecznej bioróżnorodności fagów w opracowanym biopreparacie w stosunku do mikrobioty bakteryjnej produktu.

8. Zastosowanie bakteriofagów do matryc żywnościowych istotnie obniżyło poziom zanieczyszczenia pałeczkami *Salmonella* w porównaniu z próbami kontrolnymi.
9. W przyszłości kluczowe będzie opracowanie szerokospektralnych koktajli fagowych opornych na czynniki środowiska produkcyjnego.
10. Pomimo braku dopuszczenia biopreparatów fagowych do komercyjnego stosowania w krajach członkowskich UE, stale wzrastająca wielolekooporność bakterii może doprowadzić w niedalekiej przyszłości do konieczności implementacji biokontroli fagowej do procesów produkcyjnych żywności.

7. SPIS LITERATURY

- [1] GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age–sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* **2017**, *390*, 1151–1210.
- [2] Vandevijvere, S.; De Ridder, K.; Fiolet, T.; Bel, S.; Tafforeau, J. Consumption of ultra–processed food products and diet quality among children, adolescents and adults in Belgium. *Eur. J. Nutr.* **2019**, *58*, 3267–3278.
- [3] Monteiro, C.A. Nutrition and health. The issue is not food, nor nutrients, so much as processing. *Public Health Nutr.* **2009**, *12*, 729–731.
- [4] De Corato, U. Improving the shelf–life and quality of fresh and minimally–processed fruits and vegetables for a modern food industry: a comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. *Crit. Rev. Food Sci.* **2020**, *60*, 940–975.
- [5] Meserole, L. Health foods in anti–aging therapy: reducers of physiological decline and degenerative diseases. In: *Advances in Phytomedicine*, 1st ed.; Iwu, M.M.; Wootton, J.C., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2002; Volume 1, pp. 173–196.
- [6] Ragaert, P.; Verbeke, W.; Devlieghere, F.; Debevere, J. Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. *Food Qual. Prefer.* **2004**, *15*, 259–270.
- [7] Knorr, D.; Watzke, H. Food processing at a crossroad. *Frontiers in Nutrition* **2019**, *6*, 85.
- [8] Monteiro, C.A.; Cannon, G.; Levy, R.B.; Moubarac, J.C.; Louzada, M.L.; Rauber, F.; Khandpur, N.; Cediël, G.; Neri, D.; Martinez–Steele, E.; Baraldi, L.G.; Jaime, P.C. Ultra–processed foods: what they are and how to identify them. *Public Health Nutr.* **2019**, *22*, 936–941.
- [9] Petrus, R.R.; do Amaral Sobral, P.J.; Tadini, C.C.; Gonçalves, C.B. The NOVA classification system: a critical perspective in food science. *Trends Food Sci. Tech.* **2021**, *116*, 603–608.
- [10] Monteiro, C.A.; Cannon, G.; Levy, R.; Moubarac, J.C.; Jaime, P.; Martins, A.P.; Canella, D.; Louzada, M.; Parra, D. NOVA. The star shines bright. *World Nutrition* **2016**, *7*, 28–38.
- [11] Nowicka, P.; Wojdyło, A.; Oszmiański, J. Zagrożenia powstające w żywności minimalnie przetworzonej i skuteczne metody ich eliminacji. *Żywn. Nauk. Technol. Ja.* **2014**, *2*, 5–18.

- [12] Monteiro, C.A.; Levy, R.B.; Claro, R.M.; Castro, I.R.R.D.; Cannon, G. A new classification of foods based on the extent and purpose of their processing. *Cad. Saude Publica* **2010**, *26*, 2039–2049.
- [13] Agriopoulou, S.; Stamatelopoulou, E.; Sachadyn-Król, M.; Varzakas, T. Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: quality and safety aspects. *Microorganisms* **2020**, *8*, 952.
- [14] Mostafidi, M.; Sanjabi, M.R.; Shirkhan, F.; Zahedi, M.T. A review of recent trends in the development of the microbial safety of fruits and vegetables. *Trends Food Sci. Tech.* **2020**, *103*, 321–332.
- [15] Liu, X.; Le Bourvellec, C.; Yu, J.; Zhao, L.; Wang, K.; Tao, Y.; Renard, C.M.G.C.; Hu, Z. Trends and challenges on fruit and vegetable processing: insights into sustainable, traceable, precise, healthy, intelligent, personalized and local innovative food products. *Trends Food Sci. Tech.* **2022**, *125*, 12–25.
- [16] Terefe, N.S.; Buckow, R.; Versteeg, C. Quality-related enzymes in fruit and vegetable products: effects of novel food processing technologies, part 1: high-pressure processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2014**, *54*, 24–63.
- [17] González-Aguilar, G.A.; Ayala-Zavala, J.F.; Olivas, G.I.; de la Rosa, L.A.; Álvarez-Parrilla, E. Preserving quality of fresh-cut products using safe technologies. *J. Verbrauch Lebensm.* **2010**, *5*, 65–72.
- [18] Daczkowska-Kozon, E.G.; Dłubała, A. Żywność minimalnie przetworzona o przedłużonej trwałości. Zagrożenia mikrobiologiczne. *Przemysł Spożywczy* **2015**, *69*, 43–45.
- [19] Tapia, M.S.; Alzamora, S.M.; Chirife, J. Effects of water activity (a_w) on microbial stability as a hurdle in food preservation. In: *Water activity in foods: fundamentals and applications*, 2nd ed.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Fontana Jr., A.J.; Schmidt, S.J.; Labuza, T.P., Eds.; John Wiley & Sons Ltd.: Hoboken, USA, 2020; Volume 1, pp. 323–355.
- [20] Liu, H.; Li, Z.; Zhang, X.; Liu, Y.; Hu, J.; Yang, C.; Zhao, X. The effects of ultrasound on the growth, nutritional quality and microbiological quality of sprouts. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *111*, 292–300.
- [21] Shymialevich, D.; Wójcicki, M.; Wardaszka, A.; Świder, O.; Sokołowska, B.; Błażej, S. Application of lytic bacteriophages and their enzymes to reduce saprophytic bacteria isolated from minimally processed plant-based food products – *in vitro* studies. *Viruses* **2023**, *15*, 9.
- [22] Varoquaux, P.; Wiley, R.C. Biological and biochemical changes in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In: *Minimally processed refrigerated fruits and vegetables*, 1st ed.; Yildiz, F.; Wiley, R., Eds.;

- Food Engineering Series. Springer: Boston, MA, 2017; Volume 1, pp. 226–268.
- [23] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych (dostęp on–line w dniu 21.08.2023 r.).
- [24] Wójcicki, M.; Świder, O.; Gientka, I.; Błażej, S.; Średnicka, P.; Shymialewich, D.; Cieślak, H.; Wardaszka, A.; Emanowicz, P.; Sokołowska, B.; Juszczuk-Kubiak, E. Effectiveness of a phage cocktail as a potential biocontrol agent against saprophytic bacteria in ready-to-eat plant-based food. *Viruses* **2023**, *15*, 172.
- [25] Jędrzejczyk, H.; Hoffmann, M.; Świętochowska, E. Metoda radiacyjna w utrwalaniu żywności. Część II. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego* **2011**, *1*, 83–86.
- [26] Jędrzejczyk, H.; Hoffmann, M.; Świętochowska, E. Metoda radiacyjna w utrwalaniu żywności. Część I. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego* **2010**, *2*, 98–102.
- [27] Indiarto, R.; Qonit, M.A.H. A review of irradiation technologies on food and agricultural products. *Int. J. Sci. Technol. Res.* **2020**, *9*, 4411–4414.
- [28] Ayhan, Z. Packaging and preservation methods of minimally processed produce. In: *Minimally processed refrigerated fruits and vegetables*, 1st ed.; Yildiz, F.; Wiley, R., Eds.; Food Engineering Series. Springer: Boston, MA, 2017; Volume 1, pp. 239–268.
- [29] Prakash, A.; Manley, J.; Decosta, S.; Coporasa, F.; Foley, D. The effects of gamma-irradiation in the microbiological physical and sensory qualities of diced tomatoes. *Radiat. Phys. Chem.* **2003**, *63*, 387–390.
- [30] Vanga, S.K.; Wang, J.; Jayaram, S.; Raghavan, V. Effects of pulsed electric fields and ultrasound processing on proteins and enzymes: a review. *Processes* **2021**, *9*, 722.
- [31] Mendoza, I.C.; Luna, E.O.; Pozo, M.D.; Vásquez, M.V.; Montoya, D.C.; Moran, G.C.; Romero, J.G.; Yépez, X.; Salazar, R.; Romero-Peña, M.; León, J.C. Conventional and non-conventional disinfection methods to prevent microbial contamination in minimally processed fruits and vegetables. *LWT – Food Sci. Technol.* **2022**, *165*, 113714.
- [32] Kapturowska, A.; Stolarzewicz, I.; Chmielewska, I.; Białecka-Florjańczyk, E. Ultradźwięki – narzędzie do inaktywacji komórek oraz izolacji białek wewnątrzkomórkowych. *Żywn. Nauk. Technol. Ja.* **2011**, *4*, 160–171.
- [33] Nicolau-Lapeña, I.; Lafarga, T.; Viñas, I.; Abadias, M.; Bobo, G.; Aguiló-Aguayo, I. Ultrasound processing alone or in combination with other chemical or physical treatments as a safety and quality preservation

- strategy of fresh and processed fruits and vegetables: a review. *Food Bioprocess Tech.* **2019**, *12*, 1452–1471.
- [34] Bhargava, N.; Mor, R.S.; Kumar, K.; Sharanagat, V.S. Advances in application of ultrasound in food processing: a review. *Ultrason. Sonochem.* **2021**, *70*, 105293.
- [35] Trych, U.; Buniowska-Olejnik, M.; Marszałek, K. Bioaccessibility of betalains in beetroot (*Beta vulgaris* L.) juice under different high–pressure techniques. *Molecules* **2022**, *27*, 7093.
- [36] Toepfl, S.; Mathys, A.; Heinz, V.; Knorr, D. Review: potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing. *Food Rev. Int.* **2006**, *22*, 405–423.
- [37] Guerrero-Beltrán, J.A.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Swanson, B.G. High hydrostatic pressure processing of fruit and vegetable products. *Food Rev. Int.* **2005**, *21*, 411–425.
- [38] Hać-Szymańczuk, E.; Mroczek, J. Zastosowanie techniki wysokich ciśnień w technologii żywności, a szczególnie w przetwórstwie mięsa. *Med. Weter.* **2006**, *62*, 637–640.
- [39] Florowska, A.; Florowski, T.; Sokołowska, B.; Adamczak, L.; Szymańska, I. Effects of pressure level and time treatment of high hydrostatic pressure (HHP) on inulin gelation and properties of obtained hydrogels. *Foods* **2021**, *10*, 2514.
- [40] Gómez, B.; Munekata, P.E.S.; Gavahian, M.; Barba, F.J.; Martí-Quijal, F.J.; Bolumar, T.; Campagnol, P.C.B.; Tomasevic, I.; Lorenzo, J.M. Application of pulsed electric fields in meat and fish processing industries: an overview. *Food Res. Int.* **2019**, *123*, 95–105.
- [41] Salehi, F. Physico–chemical properties of fruit and vegetable juices as affected by pulsed electric field: a review. *Int. J. Food Prop.* **2020**, *23*, 1036–1050.
- [42] Zhao, W.; Tang, Y.; Lu, L.; Chen, X.; Li, C. Pulsed electric fields processing of protein–based foods. *Food Bioprocess Tech.* **2014**, *7*, 114–125.
- [43] Firouz, M.S.; Mohi-Alden, K.; Omid, M. A critical review on intelligent and active packaging in the food industry: research and development. *Food Res. Int.* **2021**, *141*, 110113.
- [44] Valencia-Chamorro, S.A.; Palou, L.; Del Río, M.A.; Pérez-Gago, M.B. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Crit. Rev. Food Sci.* **2011**, *51*, 872–900.
- [45] Lucera, A.; Şimşek, F.; Conte, A.; Del Nobile, M.A. Minimally processed butternut squash shelf–life. *J. Food Eng.* **2012**, *113*, 322–328.

- [46] Bobo-García, G.; Arroqui, C.; Merino, G.; Vírseda, P. Antibrowning compounds for minimally processed potatoes: a review. *Food Rev. Int.* **2020**, *36*, 529–546.
- [47] Santos, M.I.S.; Marques, C.; Mota, J.; Pedroso, L.; Lima, A. Applications of essential oils as antibacterial agents in minimally processed fruits and vegetables – a review. *Microorganisms* **2022**, *10*, 760.
- [48] Raffo, A.; Paoletti, F. Fresh-cut vegetables processing: environmental sustainability and food safety issues in a comprehensive perspective. *Front. Sustain. Food Syst.* **2022**, *5*, 681459.
- [49] Ölmez, H.; Kretzschmar, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT – Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 686–693.
- [50] Ramos, B.; Miller, F.A.; Brandão, T.R.S.; Teixeira, P.; Silva, C.L.M. Fresh fruits and vegetables – an overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.* **2013**, *20*, 1–15.
- [51] Ramos, B.; Brandão, T.R.S.; Teixeira, P.; Silva, C.L.M. Biopreservation approaches to reduce *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. *Food Microbiol.* **2020**, *85*, 103282.
- [52] George, F.; Daniel, C.; Thomas, M.; Singer, E.; Guilbaud, A.; Tessier, F.J.; Revol-Junelles, A.M.; Borges, F.; Foligné, B. Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2899.
- [53] Giannakourou, M.C.; Tsironi, T.N. Application of processing and packaging hurdles for fresh-cut fruits and vegetables preservation. *Foods* **2021**, *10*, 830.
- [54] Chandra, P.; Unnikrishnan, M.K.; Vandana, K.E.; Mukhopadhyay, C.; Dinesh Acharya, U.; Surulivel Rajan, M.; Rajesh, V. Antimicrobial resistance and the post antibiotic era: better late than never effort. *Expert Opin. Drug Saf.* **2021**, *20*, 1375–1390.
- [55] Kose, A.; Colak, C. Knowledge and awareness of physicians about rational antibiotic use and antimicrobial resistance before and after graduation: a cross-sectional study conducted in Malatya Province in Turkey. *Infection and Drug Resistance* **2021**, *14*, 2557–2568.
- [56] Ben, Y.; Fu, C.; Hu, M.; Liu, L.; Wong, M.H.; Zheng, C. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: a review. *Environ. Res.* **2019**, *169*, 483–493.
- [57] Godziszewska, J.; Guzek, D.; Głąbski, K.; Wierzbicka, A. Mobilna antybiotykooporność – o rozprzestrzenianiu się genów determinujących oporność bakterii poprzez produkty spożywcze. *Postep. Hig. Med. Dosw.* **2016**, *70*, 803–810.

- [58] Mole, B. MRSA: farming up trouble. *Nature* **2013**, *499*, 398–400.
- [59] Wang, N.; Yang, X.; Jiao, S.; Zhang, J.; Ye, B.; Gao, S. Sulfonamide-resistant bacteria and their resistance genes in soils fertilized with manures from Jiangsu Province, Southeastern China. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e112626.
- [60] Vinayamohan, P.G.; Pellissery, A.J.; Venkitanarayanan, K. Role of horizontal gene transfer in the dissemination of antimicrobial resistance in food animal production. *Current Opinion in Food Science* **2022**, *47*, 100882.
- [61] Llor, C.; Bjerrum, L. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther. Adv. Drug Saf.* **2014**, *5*, 229–241.
- [62] Oluwafemi, R.A.; Olawale, I.; Alagbe, J.O. Recent trends in the utilization of medicinal plants as growth promoters in poultry nutrition – a review. *Research in: Agricultural and Veterinary Sciences* **2020**, *4*, 5–11.
- [63] Cuong, N.V.; Kiet, B.T.; Hien, V.B.; Truong, B.D.; Phu, D.H.; Thwaites, G.; Choisy, M.; Carrique-Mas, J. Antimicrobial use through consumption of medicated feeds in chicken flocks in the Mekong Delta of Vietnam: a three-year study before a ban on antimicrobial growth promoters. *PLOS ONE* **2021**, *16*, e0250082.
- [64] Rada Unii Europejskiej. Programme of Community action in the field of public health (2003 to 2008) (dostęp on-line w dniu 22.08.2023 r.).
- [65] Narodowy Program Ochrony Antybiotyków: <https://antybiotyki.edu.pl/> (dostęp on-line w dniu 22.08.2023 r.).
- [66] Markiewicz, Z.; Korsak, D.; Popowska, M. Antybiotyki w dobie narastającej lekooporności. Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, Polska, 2021; Wydanie I.
- [67] Etebu, E.; Arikekpar, I. Antibiotics: classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.* **2016**, *4*, 90–101.
- [68] Begum, S.; Begum, T.; Rahman, N.; Khan, R.A. A review on antibiotic resistance and way of combating antimicrobial resistance. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences* **2021**, *14*, 087–097.
- [69] Bitew, Z.; Amare, M. Recent reports on electrochemical determination of selected antibiotics in pharmaceutical formulations: a mini review. *Electrochem. Commun.* **2020**, *121*, 106863.
- [70] Al-Hasani, H.M.; Al-Rubaye, D.S.; Abdelhameed, A. The emergence of multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR), and pandrug-resistant (PDR) in Iraqi clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology* **2023**, *30*, 469–482.

- [71] Rafailidis, P.I.; Kofteridis, D. Proposed amendments regarding the definitions of multidrug-resistant and extensively drug-resistant bacteria. *Expert Rev. Anti-Infe.* **2022**, *20*, 139–146.
- [72] Alkofide, H.; Alhammad, A.M.; Alruwaili, A.; Aldemerdash, A.; Almangour, T.A.; Alsuwayegh, A.; Almoqbel, D.; Albaty, A.; Alsaud, A.; Enani, M. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Enterobacteriaceae*: prevalence, treatments, and outcomes – a retrospective cohort study. *Infection and Drug Resistance* **2020**, *13*, 4653–4662.
- [73] Hasan, T.H.; Al-Harmoosh, R.A. Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria. *Sys. Rev. Pharm.* **2020**, *11*, 817–823.
- [74] Kakoullis, L.; Papachristodoulou, E.; Chra, P.; Panos, G. Mechanisms of antibiotic resistance in important Gram-positive and Gram-negative pathogens and novel antibiotic solutions. *Antibiotics* **2021**, *10*, 415.
- [75] Mancuso, G.; Midiri, A.; Gerace, E.; Biondo, C. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens* **2021**, *10*, 1310.
- [76] Hryniewicz W.; Żabicka D. Stanowisko Zespołu Roboczego ds. oznaczania lekowrażliwości zgodnie z zaleceniami EUCAST w sprawie najczęściej zgłaszanych pytań dotyczących stosowania rekomendacji EUCAST – wersja 6.0 z dnia 30 maja 2023 (dostęp on-line w dniu 23.08.2023 r.).
- [77] Naskar, A.; Kim, K.S. Nanomaterials as delivery vehicles and components of new strategies to combat bacterial infections: advantages and limitations. *Microorganisms* **2019**, *7*, 356.
- [78] Makumi, A.; Mhone, A.L.; Odaba, J.; Guantai, L.; Svitek, N. Phages for Africa: the potential benefit and challenges of phage therapy for the livestock sector in Sub-Saharan Africa. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1085.
- [79] Pires, D.P.; Costa, A.R.; Pinto, G.; Meneses, L.; Azeredo, J. Current challenges and future opportunities of phage therapy. *FEMS Microbiol. Rev.* **2020**, *44*, 684–700.
- [80] Żaczek, M.; Weber-Dąbrowska, B.; Międzybrodzki, R.; Łusiak-Szelachowska, M.; Górski, A. Phage therapy in Poland – a centennial journey to the first ethically approved treatment facility in Europe. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1056.
- [81] Dąbrowska, K. Phage therapy: what factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39*, 2000–2025.
- [82] Rostkowska, O.M.; Międzybrodzki, R.; Miszewska-Szyszkowska, D.; Górski, A.; Durlik, M. Treatment of recurrent urinary tract infections in a 60-year-old kidney transplant recipient. The use of phage therapy. *Transpl. Infect. Dis.* **2021**, *23*, e13391.

- [83] Mahony, J.; Casey, E.; van Sinderen, D. The impact and applications of phages in the food industry and agriculture. *Viruses* **2020**, *12*, 210.
- [84] Xu, Y. Phage and phage lysins: new era of bio-preservatives and food safety agents. *J. Food Sci.* **2021**, *86*, 3349–3373.
- [85] Wójcicki, M.; Błażej, S.; Gientka, I.; Brzezicka, K. The concept of using bacteriophages to improve the microbiological quality of minimally processed foods. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2019**, *18*, 373–383.
- [86] Holtappels, D.; Alfenas-Zerbini, P.; Koskella, B. Drivers and consequences of bacteriophage host range. *FEMS Microbiol. Rev.* **2023**, *47*, fuad038.
- [87] Ali, A.; Jørgensen, J.S.; Lamont, R.F. The contribution of bacteriophages to the aetiology and treatment of the bacterial vaginosis syndrome. *Faculty Reviews* **2022**, *11*, 8.
- [88] Dion, M.B.; Oechslin, F.; Moineau, S. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 125–138.
- [89] Ramos-Vivas, J.; Superio, J.; Galindo-Villegas, J.; Acosta, F. Phage therapy as a focused management strategy in aquaculture. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10436.
- [90] Siddell, S.G.; Smith, D.B.; Adriaenssens, E.; Alfenas-Zerbini, P.; Dutilh, B.E.; Garcia, M.L.; Junglen, S.; Krupovic, M.; Kuhn, J.H.; Lambert, A.J.; Lefkowitz, E.J.; Łobocka, M.; Mushegian, A.R.; Oksanen, H.M.; Robertson, D.L.; Rubino, L.; Sabanadzovic, S.; Simmonds, P.; Suzuki, N.; Van Doorslaer, K.; Vandamme, A.-M.; Varsani, A.; Zerbini, F.M. Virus taxonomy and the role of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *J. Gen. Virol.* **2023**, *104*, 001840.
- [91] Van Regenmortel, M.H.; Ackermann, H.W.; Calisher, C.H.; Dietzgen, R.G.; Horzinek, M.C.; Keil, G.M.; Mahy, B.W.J.; Martelli, G.P.; Murphy, F.A.; Pringle, C.; Rima, B.K.; Skern, T.; Vetten, H.-J.; Weaver, S.C. Virus species polemics: 14 senior virologists oppose a proposed change to the ICTV definition of virus species. *Arch. Virol.* **2013**, *158*, 1115–1119.
- [92] Adriaenssens, E.; Brister, J.R. How to name and classify your phage: an informal guide. *Viruses* **2017**, *9*, 70.
- [93] Lefkowitz, E.J.; Dempsey, D.M.; Hendrickson, R.C.; Orton, R.J.; Siddell, S.G.; Smith, D.B. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* **2017**, *46*, D708–D717.
- [94] Zerbini, F.M.; Siddell, S.G.; Mushegian, A.R.; Walker, P.J.; Lefkowitz, E.J.; Adriaenssens, E.M.; Alfenas-Zerbini, P.; Dutilh, B.E.; García, M.L.; Junglen, S.; Krupovic, M.; Kuhn, J.H.; Lambert, A.J.; Łobocka, M.; Oksanen, H.M.; Robertson, D.L.; Rubino, L.; Sabanadzovic, S.; Simmonds, P.; Suzuki, N.; Van Doorslaer, K.; Vandamme, A.-M.; Varsani, A.

- Differentiating between viruses and virus species by writing their names correctly. *Arch. Virol.* **2022**, *167*, 1231–1234.
- [95] Turner, D.; Shkoporov, A.N.; Lood, C.; Millard, A.D.; Dutilh, B.E.; Alfenas-Zerbini, P.; van Zyl, L.J.; Aziz, R.K.; Oksanen, H.M.; Poranen, M.M.; Kropinski, A.M.; Barylski, J.; Brister, J.R.; Chanisvili, N.; Edwards, R.A.; Enault, F.; Gillis, A.; Knezevic, P.; Krupovic, M.; Kurtböke, I.; Kushkina, A.; Lavigne, R.; Lehman, S.; Łobocka, M.; Moraru, C.; Switt, A.M.; Morozova, V.; Nakavuma, J.; Muñoz, A.R.; Rūmnieks, J.; Sarkar, B.L.; Sullivan, M.B.; Uchiyama, J.; Wittmann, J.; Yigang, T.; Adriaenssens, E.M. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Arch. Virol.* **2023**, *168*, 74.
- [96] Lood, C.; Boeckaerts, D.; Stock, M.; De Baets, B.; Lavigne, R.; van Noort, V.; Briers, Y. Digital phagograms: predicting phage infectivity through a multilayer machine learning approach. *Curr. Opin. Virol.* **2022**, *52*, 174–181.
- [97] Boeckaerts, D.; Stock, M.; De Baets, B.; Briers, Y. Identification of phage receptor-binding protein sequences with hidden Markov models and an extreme gradient boosting classifier. *Viruses* **2022**, *14*, 1329.
- [98] Andrade-Martínez, J.S.; Camelo Valera, L.C.; Chica Cardenas, L.A.; Forero-Junco, L.; López-Leal, G.; Moreno-Gallego, J.L.; Rangel-Pineros, G.; Reyes, A. Computational tools for the analysis of uncultivated phage genomes. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **2022**, *86*, e00004–21.
- [99] Jiang, J.Z.; Yuan, W.G.; Shang, J.; Shi, Y.H.; Yang, L.L.; Liu, M.; Zhu, P.; Jin, T.; Sun, Y.; Yuan, L.H. Virus classification for viral genomic fragments using PhaGCN2. *Brief. Bioinform.* **2023**, *24*, bbac505.
- [100] Cebeci, A.; Türe, M.; Alemdağ, M.; Altinok, I. Whole genome sequence of a novel bacteriophage APT65 infecting *Aeromonas hydrophila*. *PHAGE* **2023**, *4*, 46–50.
- [101] Tynecki, P.; Guziński, A.; Kazimierzak, J.; Jadczyk, M.; Dastyk, J.; Onisko, A. PhageAI – bacteriophage life cycle recognition with machine learning and natural language processing. *bioRxiv* **2020**, 198606.
- [102] Liu, Y.; Demina, T.A.; Roux, S.; Aiewsakun, P.; Kazlauskas, D.; Simmonds, P.; Prangishvili, D.; Oksanen, H.M.; Krupovic, M. Diversity, taxonomy, and evolution of archaeal viruses of the class *Caudoviricetes*. *PLOS Biol.* **2021**, *19*, e3001442.
- [103] International Committee on Taxonomy of Viruses: <https://ictv.global/> (dostęp on-line w dniu 28.09.2023 r.).
- [104] Stone, E.; Campbell, K.; Grant, I.; McAuliffe, O. Understanding and exploiting phage-host interactions. *Viruses* **2019**, *11*, 567.

- [105] Chevallereau, A.; Pons, B.J.; van Houte, S.; Westra, E.R. Interactions between bacterial and phage communities in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* **2022**, *20*, 49–62.
- [106] Sieiro, C.; Areal-Hermida, L.; Pichardo-Gallardo, Á.; Almuiña-González, R.; de Miguel, T.; Sánchez, S.; Sánchez-Pérez, Á.; Villa, T.G. A hundred years of bacteriophages: can phages replace antibiotics in agriculture and aquaculture? *Antibiotics* **2020**, *9*, 493.
- [107] Zia, S.; Alkheraije, K.A. Recent trends in the use of bacteriophages as replacement of antimicrobials against food–animal pathogens. *Frontiers in Veterinary Science* **2023**, *10*, 1162465.
- [108] Schmalstig, A.A.; Freidy, S.; Hanafin, P.O.; Braunstein, M.; Rao, G.G. Reapproaching old treatments: considerations for PK/PD studies on phage therapy for bacterial respiratory infections. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2021**, *109*, 1443–1456.
- [109] Kowalska, J.D.; Kazimierczak, J.; Sowińska, P.M.; Wójcik, E.A.; Siwicki, A.K.; Dastyh, J. Growing trend of fighting infections in aquaculture environment – opportunities and challenges of phage therapy. *Antibiotics* **2020**, *9*, 301.
- [110] Berngruber, T.W.; Lion, S.; Gandon, S. Spatial structure, transmission modes and the evolution of viral exploitation strategies. *PLOS Pathog.* **2015**, *11*, e1004810.
- [111] Cieślik, M.; Bagińska, N.; Jończyk-Matysiak, E.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, G.; Górski, A. Temperate bacteriophages – the powerful indirect modulators of eukaryotic cells and immune functions. *Viruses* **2021**, *13*, 1013.
- [112] Zhang, M.; Zhang, T.; Yu, M.; Chen, Y.-L.; Jin, M. The life cycle transitions of temperate phages: regulating factors and potential ecological implications. *Viruses* **2022**, *14*, 1904.
- [113] Cui, J.; Zhong, W.; Liu, W.; Zhang, C.; Zou, L.; Ren, H. Whole genome sequencing and annotation of a lysogenic phage vB_EcoP_DE5 isolated from donkey–derived *Escherichia coli*. *Virus Genes* **2023**, *59*, 290–300.
- [114] Nawel, Z.; Rima, O.; Amira, B. An overview on *Vibrio* temperate phages: integration mechanisms, pathogenicity, and lysogeny regulation. *Microb. Pathogenesis* **2022**, *165*, 105490.
- [115] Sausset, R.; Petit, M.A.; Gaboriau-Routhiau, V.; De Paepe, M. New insights into intestinal phages. *Mucosal Immunol.* **2020**, *13*, 205–215.
- [116] Henrot, C.; Petit, M.A. Signals triggering prophage induction in the gut microbiota. *Mol. Microbiol.* **2022**, *118*, 494–502.

- [117] Kamat, A.; Badrinarayanan, A. SOS-independent bacterial DNA damage responses: diverse mechanisms, unifying function. *Curr. Opin. Microbiol.* **2023**, *73*, 102323.
- [118] Silpe, J.E.; Wong, J.W.; Owen, S.V.; Baym, M.; Balskus, E.P. The bacterial toxin colibactin triggers prophage induction. *Nature* **2022**, *603*, 315–320.
- [119] Secor, P.R.; Burgener, E.B.; Kinnersley, M.; Jennings, L.K.; Roman-Cruz, V.; Popescu, M.; Van Belleghem, J.D.; Haddock, N.; Copeland, C.; Michaels, L.A.; de Vries, C.R.; Chen, Q.; Pourtois, J.; Wheeler, T.J.; Milla, C.E.; Bollyky, P.L. Pf bacteriophage and their impact on *Pseudomonas* virulence, mammalian immunity, and chronic infections. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 244.
- [120] Schulz, P.; Pajdak-Czaus, J.; Siwicki, A.K. *In vivo* bacteriophages' application for the prevention and therapy of aquaculture animals – chosen aspects. *Animals* **2022**, *12*, 1233.
- [121] Luong, T.; Salabarria, A.C.; Roach, D.R. Phage therapy in the resistance era: where do we stand and where are we going?. *Clin. Ther.* **2020**, *42*, 1659–1680.
- [122] Endersen, L.; Coffey, A. The use of bacteriophages for food safety. *Current Opinion in Food Science* **2020**, *36*, 1–8.
- [123] Popescu, M.; Van Belleghem, J.D.; Khosravi, A.; Bollyky, P.L. Bacteriophages and the immune system. *Ann. Rev. Virol.* **2021**, *8*, 415–435.
- [124] Podlacha, M.; Grabowski, Ł.; Kosznik-Kwaśnicka, K.; Zdrojewska, K.; Stasiłojć, M.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, A. Interactions of bacteriophages with animal and human organisms – safety issues in the light of phage therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8937.
- [125] Hsu, C.L.; Duan, Y.; Fouts, D.E.; Schnabl, B. Intestinal virome and therapeutic potential of bacteriophages in liver disease. *J. Hepatol.* **2021**, *75*, 1465–1475.
- [126] Manrique, P.; Dills, M.; Young, M.J. The human gut phage community and its implications for health and disease. *Viruses* **2017**, *9*, 141.
- [127] Jończyk-Matysiak, E.; Weber-Dąbrowska, B.; Owczarek, B.; Międzybrodzki, R.; Łusiak-Szelachowska, M.; Łodej, N.; Górski, A. Phage-phagocyte interactions and their implications for phage application as therapeutics. *Viruses* **2017**, *9*, 150.
- [128] Federici, S.; Nobs, S.P.; Elinav, E. Phages and their potential to modulate the microbiome and immunity. *Cell. Mol. Immunol.* **2021**, *18*, 889–904.
- [129] Zimecki, M.; Weber-Dąbrowska, B.; Łusiak-Szelachowska, M.; Mulczyk, M.; Boratyński, J.; Poźniak, G.; Syper, D.; Górski, A. Bacteriophages provide regulatory signals in mitogen-induced murine splenocyte proliferation. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2003**, *8*, 699–711.

- [130] Shuwen, H.; Kefeng, D. Intestinal phages interact with bacteria and are involved in human diseases. *Gut Microbes* **2022**, *14*, 2113717.
- [131] Arumugam, S.N.; Manohar, P.; Sukumaran, S.; Sadagopan, S.; Loh, B.; Leptihn, S.; Nachimuthu, R. Antibacterial efficacy of lytic phages against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in bacteraemia mice models. *BMC Microbiol.* **2022**, *22*, 187.
- [132] Liu, S.; Lu, H.; Zhang, S.; Shi, Y.; Chen, Q. Phages against pathogenic bacterial biofilms and biofilm-based infections: a review. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 427.
- [133] Blasco, L.; Bleriot, I.; González de Aledo, M.; Fernández-García, L.; Pacios, O.; Oliveira, H.; López, M.; Ortiz-Cartagena, C.; Fernández-Cuenca, F.; Pascual, Á.; Martínez-Martínez, L.; Pachón, J.; Azeredo, J.; Tomás, M. Development of an anti-*Acinetobacter baumannii* biofilm phage cocktail: genomic adaptation to the host. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2022**, *66*, e0192321.
- [134] Zhou, Y.; Li, L.; Han, K.; Wang, L.; Cao, Y.; Ma, D.; Wang, X. A polyvalent broad-spectrum *Escherichia* phage *Tequatrovirus* EP01 capable of controlling *Salmonella* and *Escherichia coli* contamination in foods. *Viruses* **2022**, *14*, 286.
- [135] Ortiz Charneco, G.; de Waal, P.P.; van Rijswijck, I.M.; van Peij, N.N.; van Sinderen, D.; Mahony, J. Bacteriophages in the dairy industry: a problem solved?. *Annu. Rev. Food Sci. T.* **2023**, *14*, 367–385.
- [136] Olejnik-Schmidt, A.; Pietrzak, B.; Kawacka, I.; Malak, K.; Wawrzyniak, W.; Schmidt, M. A simple method for assessing diversity and dynamics of microbial community: comparison of dairy phages from industrial and spontaneous fermentation. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 8915.
- [137] Guo, Y.; Li, J.; Islam, M.S.; Yan, T.; Zhou, Y.; Liang, L.; Connerton, I.F.; Deng, K.; Li, J. Application of a novel phage vB_SalS-LPSTLL for the biological control of *Salmonella* in foods. *Food Res. Int.* **2021**, *147*, 110492.
- [138] Michaelis, C.; Grohmann, E. Horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes in biofilms. *Antibiotics* **2023**, *12*, 328.
- [139] Gummalla, V.S.; Zhang, Y.; Liao, Y.-T.; Wu, V.C.H. The role of temperate phages in bacterial pathogenicity. *Microorganisms* **2023**, *11*, 541.
- [140] Wang, Y.; Deng, J.; Ren, J.; Liang, L.; Li, J.; Niu, S.; Wu, X.; Zhao, Y.; Gao, S.; Yan, F.; Liu, Y.; Ma, H.; Tian, W.X.; Yan, Y. RAP44 phage integrase-guided 50K genomic island integration in *Riemerella anatipestifer*. *Frontiers in Veterinary Science* **2022**, *9*, 961354.
- [141] Khouadja, S.; Roque, A.; Gonzalez, M.; Furones, D. *Vibrio* pathogenicity island and phage CTX genes in *Vibrio alginolyticus* isolated from different aquatic environments. *J. Water Health* **2022**, *20*, 1469–1478.

- [142] Hibstu, Z.; Belew, H.; Akelew, Y.; Mengist, H.M. Phage therapy: a different approach to fight bacterial infections. *Biol. Targets Ther.* **2022**, *16*, 173–186.
- [143] Azam, A.H.; Tanji, Y. Bacteriophage–host arm race: an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 2121–2131.
- [144] Jariah, R.O.A.; Hakim, M.S. Interaction of phages, bacteria, and the human immune system: evolutionary changes in phage therapy. *Rev. Med. Virol.* **2019**, *29*, e2055.
- [145] Isaev, A.B.; Musharova, O.S.; Severinov, K.V. Microbial arsenal of antiviral defenses – part I. *Biochem. (Mosc.)* **2021**, *86*, 319–337.
- [146] Eriksen, R.S.; Malhotra, N.; Seshasayee, A.S.N.; Sneppen, K.; Krishna, S. Emergence of networks of shared restriction–modification systems in phage–bacteria ecosystems. *J. Bioscience.* **2022**, *47*, 38.
- [147] Bravo, J.P.; Aparicio-Maldonado, C.; Nobrega, F.L.; Brouns, S.J.; Taylor, D.W. Structural basis for broad anti–phage immunity by DISARM. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 2987.
- [148] Morgan, T.; Rezende, R.R.d.; Lima, T.T.M.; Souza, F.d.O.; Alfenas-Zerbini, P. Genomic analysis unveils the pervasiveness and diversity of prophages infecting *Erwinia* species. *Pathogens* **2023**, *12*, 44.
- [149] Tesson, F.; Bernheim, A. Synergy and regulation of antiphage systems: toward the existence of a bacterial immune system? *Curr. Opin. Microbiol.* **2023**, *71*, 102238.
- [150] Hampton, H.G.; Watson, B.N.J.; Fineran, P.C. The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature* **2020**, *577*, 327–336.
- [151] Yuan, X.; Huang, Z.; Zhu, Z.; Zhang, J.; Wu, Q.; Xue, L.; Wang, J.; Ding, Y. Recent advances in phage defense systems and potential overcoming strategies. *Biotechnol. Adv.* **2023**, *65*, 108152.
- [152] Abdelsattar, A.S.; Dawooud, A.; Rezk, N.; Makky, S.; Safwat, A.; Richards, P.J.; El-Shibiny, A. How to train your phage: the recent efforts in phage training. *Biologics* **2021**, *1*, 70–88
- [153] Knecht, L.E.; Veljkovic, M.; Fieseler, L. Diversity and function of phage encoded depolymerases. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 2949.
- [154] Sun, C.L.; Barrangou, R.; Thomas, B.C.; Horvath, P.; Fremaux, C.; Banfield, J.F. Phage mutations in response to CRISPR diversification in a bacterial population. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 463–470.
- [155] Abraha, H.B.; Kim, K.P.; Sbhatu, D.B. Bacteriophages for detection and control of foodborne bacterial pathogens – the case of *Bacillus cereus* and their phages. *J. Food Saf.* **2021**, *43*, e12906.

- [156] Weber-Dąbrowska, B.; Jończyk-Matysiak, E.; Żaczek, M.; Łobocka, M.; Łusiak-Szelachowska, M.; Górski, A.J.F. Bacteriophage procurement for therapeutic purposes. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1177.
- [157] Vázquez, R.; Díez-Martínez, R.; Domingo-Calap, P.; García, P.; Gutiérrez, D.; Muniesa, M.; Ruiz-Ruigómez, M.; Sanjuán, R.; Tomás, M.; Tormo-Mas, M.Á.; García, P. Essential topics for the regulatory consideration of phages as clinically valuable therapeutic agents: a perspective from Spain. *Microorganisms* **2022**, *10*, 717.
- [158] Bumunang, E.W.; Zaheer, R.; Niu, D.; Narvaez-Bravo, C.; Alexander, T.; McAllister, T.A.; Stanford, K. Bacteriophages for the targeted control of foodborne pathogens. *Foods* **2023**, *12*, 2734.
- [159] Gientka, I.; Wójcicki, M.; Żuwalski, A.W.; Błażej, S. Use of phage cocktail for improving the overall microbiological quality of sprouts – two methods of application. *Appl. Microbiol.* **2021**, *1*, 289–303.
- [160] Połaska, M.; Sokołowska, B. Bacteriophages – a new hope or a huge problem in the food industry. *AIMS Microbiol.* **2019**, *5*, 324–346.
- [161] Metssemakers, W.-J.; Onsea, J.; Fintan Moriarty, T.; Pruidze, N.; Nadareishvili, L.; Dadiani, M.; Kutateladze, M.; Eliava, G. Bacteriophage therapy for human musculoskeletal and skin/soft tissue infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **2023**, *29*, 695–701.
- [162] Liang, S.; Qi, Y.; Yu, H.; Sun, W.; Raza, S.H.A.; Alkhorayef, N.; Alkhalil, S.S.; Salama, E.E.A.; Zhang, L. Bacteriophage therapy as an application for bacterial infection in China. *Antibiotics* **2023**, *12*, 417.
- [163] Djebara, S.; Maussen, C.; De Vos, D.; Merabishvili, M.; Damanet, B.; Pang, K.W.; De Leenheer, P.; Strachinaru, I.; Soentjens, P.; Pirnay, J.-P. Processing phage therapy requests in a Brussels military hospital: lessons identified. *Viruses* **2019**, *11*, 265.
- [164] Jończyk-Matysiak, E.; Łusiak-Szelachowska, M.; Kłak, M.; Bubak, B.; Międzybrodzki, R.; Weber-Dąbrowska, B.; Żaczek, M.; Fortuna, W.; Rogóż, P.; Letkiewicz, S.; Szufnarowski, K.; Górski, A. The effect of bacteriophage preparations on intracellular killing of bacteria by phagocytes. *J. Immunol. Res.* **2015**, *2015*, 482863.
- [165] Kawacka, I.; Olejnik-Schmidt, A.; Schmidt, M.; Sip, A. Effectiveness of phage-based inhibition of *Listeria monocytogenes* in food products and food processing environments. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1764.
- [166] Osei, E.K.; Mahony, J.; Kenny, J.G. From farm to fork: *Streptococcus suis* as a model for the development of novel phage-based biocontrol agents. *Viruses* **2022**, *14*, 1996.
- [167] Moye, Z.D.; Woolston, J.; Sulakvelidze, A. Bacteriophage application for food production and processing. *Viruses* **2018**, *10*, 205.

- [168] Svircev, A.; Roach, D.; Castle, A. Framing the future with bacteriophages in agriculture. *Viruses* **2018**, *10*, 218.
- [169] Jakobsen, R.R.; Trinh, J.T.; Bomholtz, L.; Brok-Lauridsen, S.K.; Sulakvelidze, A.; Nielsen, D.S. A bacteriophage cocktail significantly reduces *Listeria monocytogenes* without deleterious impact on the commensal gut microbiota under simulated gastrointestinal conditions. *Viruses* **2022**, *14*, 190.
- [170] Kahn, L.H.; Bergeron, G.; Bourassa, M.W.; De Vegt, B.; Gill, J.; Gomes, F.; Malouin, F.; Opengart, K.; Ritter, G.D.; Singer, R.S.; Storrs, C.; Topp, E. From farm management to bacteriophage therapy: strategies to reduce antibiotic use in animal agriculture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1441*, 31–39.
- [171] Wójcik, E.A.; Stańczyk, M.; Wojtasik, A.; Kowalska, J.D.; Nowakowska, M.; Łukasiak, M.; Bartnicka, M.; Kazimierczak, J.; Dastyk, J. Comprehensive evaluation of the safety and efficacy of BAFASAL® bacteriophage preparation for the reduction of *Salmonella* in the food chain. *Viruses* **2020**, *12*, 742.
- [172] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Safety and efficacy of a feed additive consisting on the bacteriophages PCM F/00069, PCM F/00070, PCM F/00071 and PCM F/00097 infecting *Salmonella Gallinarum* B/00111 (Bafasal®) for all avian species (Proteon Pharmaceuticals SA). *EFSA J.* **2021**, *19*, e06534.
- [173] EFSA. Evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for reduction of pathogens on different ready-to-eat (RTE) food products. EFSA Panel on Biological Hazards. *EFSA J.* **2016**, *14*, 1–94.
- [174] U.S. Food & Drug Administration GRAS Notice No. 528: <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=528> (dostęp on-line w dniu 03.09.2023 r.).
- [175] Tanmoy, A.M.; Saha, C.; Sajib, M.S.I.; Saha, S.; Komurian-Pradel, F.; van Belkum, A.; Louwen, R.; Saha, S.K.; Endtz, H.P. CRISPR-Cas diversity in clinical *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from South Asian countries. *Genes* **2020**, *11*, 1365.
- [176] European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union one health 2021 zoonoses report. *EFSA J.* **2022**, *20*, 7666.
- [177] Główny Inspektorat Sanitarny. Stan Sanitarny Kraju w 2022 roku: <https://www.gov.pl/web/gis/raport---stan-sanitarny-kraju> (dostęp on-line w dniu 12.09.2023 r.).

- [178] WHO. *Salmonella* (non-typhoidal): [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(nontyphoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(nontyphoidal)) (dostęp on-line w dniu 12.09.2023 r.).
- [179] European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA J.* **2022**, *20*, 7209.
- [180] Nikiema, M.E.M.; Kakou-Ngazona, S.; Ky/By, A.; Sylla, A.; Bako, E.; Addablah, A.Y.A.; Ouoba, J.B.; Sampo, E.; Gnada, K.; Zongo, O.; Traoré, K.A.; Sanou, A.; Bonkougou, I.J.O.; Ouédraogo, R.; Barro, N.; Sangaré, L. Characterization of virulence factors of *Salmonella* isolated from human stools and street food in urban areas of Burkina Faso. *BMC Microbiol.* **2021**, *21*, 1–12.
- [181] Li, Q.; Cheng, W.; Zhang, D.; Yu, T.; Yin, Y.; Ju, H.; Ding, S. Rapid and sensitive strategy for *Salmonella* detection using an *InvA* gene-based electrochemical DNA sensor. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2012**, *7*, 844–856.
- [182] El-Sebay, N.A.; Abu Shady, H.M.; El-Rashed El-Zeedy, S.A.; Samy, A.A. *InvA* gene sequencing of *Salmonella* Typhimurium isolated from Egyptian poultry. *Asian J. Sci. Res.* **2017**, *10*, 194–202.
- [183] Song, X.; Zhang, H.; Ma, S.; Song, Y.; Lv, R.; Liu, X.; Yang, B.; Huang, D.; Jiang, L. Transcriptome analysis of virulence gene regulation by the ATP-dependent Lon protease in *Salmonella* Typhimurium. *Future Microbiol.* **2019**, *14*, 1109–1122.
- [184] Culler, H.F.; Couto, S.C.F.; Higa, J.S.; Ruiz, R.M.; Yang, M.J.; Bueris, V.; Franzolin, M.R.; Sircili, M.P. Role of SdiA on biofilm formation by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Genes* **2018**, *9*, 253.
- [185] Li, J.; Li, N.; Ning, C.; Guo, Y.; Ji, C.; Zhu, X.; Zhang, X.; Meng, Q.; Shang, Y.; Xiao, C.; Xia, X.; Cai, X.; Qiao, J. sRNA *STnc150* is involved in virulence regulation of *Salmonella* Typhimurium by targeting *fimA* mRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **2021**, *368*, fnab124.
- [186] Prager, R.; Fruth, A.; Tschäpe, H. *Salmonella* enterotoxin (*stn*) gene is prevalent among strains of *Salmonella enterica*, but not among *Salmonella bongori* and other *Enterobacteriaceae*. *FEMS Immunol. Med. Mic.* **1995**, *12*, 47–50.
- [187] Khalefa, H.S.; Ahmed, Z.S.; Abdel-Kader, F.; Ismail, E.M.; Elshafiee, E.A. Sequencing and phylogenetic analysis of the *stn* gene of *Salmonella* species isolated from different environmental sources at Lake Qarun protectorate: the role of migratory birds and public health importance. *Vet. World* **2021**, *14*, 2764.

- [188] Krzyzanowski, F.; Zappelini, L.; Martone-Rocha, S.; Dropa, M.; Matté, M.H.; Nacache, F.; Razzolini, M.T.P. Quantification and characterization of *Salmonella* spp. isolates in sewage sludge with potential usage in agriculture. *BMC Microbiol.* **2014**, *14*, 1–9.
- [189] Bolton, D.J.; Ivory, C.; McDowell, D. A study of *Salmonella* in pigs from birth to carcass: serotypes, genotypes, antibiotic resistance and virulence profiles. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *160*, 298–303.
- [190] Koczerka, M.; Douarre, P.E.; Kempf, F.; Holbert, S.; Mistou, M.Y.; Grépinet, O.; Virlogeux-Payant, I. The invasin and complement-resistance protein Rck of *Salmonella* is more widely distributed than previously expected. *Microbiol. Spectr.* **2021**, *9*, e01457-21.
- [191] Barilleau, E.; Védrine, M.; Koczerka, M.; Burlaud-Gaillard, J.; Kempf, F.; Grépinet, O.; Virlogeux-Payant, I.; Velge, P.; Wiedemann, A. Investigation of the invasion mechanism mediated by the outer membrane protein PagN of *Salmonella* Typhimurium. *BMC Microbiol.* **2021**, *21*, 1–18.
- [192] Deguenon, E.; Dougnon, V.; Lozes, E.; Maman, N.; Agbankpe, J.; Abdel-Massih, R.M.; Djegui, F.; Baba-Moussa, J.; Dougnon, J. Resistance and virulence determinants of faecal *Salmonella* spp. isolated from slaughter animals in Benin. *BMC Res. Notes* **2019**, *12*, 1–7.
- [193] Hughes, D.L. Patent review of manufacturing routes to fifth-generation cephalosporin drugs. Part 2, ceftaroline fosamil and ceftobiprole medocaril. *Org. Process. Res. Dev.* **2017**, *21*, 800–815.
- [194] Mehta, D.; Sharma, A.K. Cephalosporins: a review on imperative class of antibiotics. *Inventi. Rapid Mol. Pharmacol.* **2016**, *1*, 1–6.
- [195] Pławińska-Czarnak, J.; Wódz, K.; Kizerwetter-Świda, M.; Bogdan, J.; Kwieciński, P.; Nowak, T.; Strzałkowska, Z.; Anusz, K. Multi-drug resistance to *Salmonella* spp. when isolated from raw meat products. *Antibiotics* **2022**, *11*, 876.
- [196] European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. *EFSA J.* **2023**, *21*, 7867.
- [197] Chen, T.; Jiang, J.; Ye, C.; Xie, J.; Chen, X.; Xu, D.; Zeng, Z.; Peng, Y.; Hu, D.-L.; Fang, R. Genotypic characterization and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* isolated from chicken, pork and the environment at abattoirs and supermarkets in Chongqing, China. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 1–8.
- [198] Maka, L.; Popowska, M. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food. *Rocz. Państwowego Zakładu Hig.* **2016**, *67*, 343–358.

- [199] Ali, T.; Ali, I.; Khan, N.A.; Han, B.; Gao, J. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 9519718.
- [200] Meini, S.; Tascini, C.; Cei, M.; Sozio, E.; Rossolini, G.M. AmpC-lactamase-producing *Enterobacteriales*: what a clinician should know. *Infection* **2019**, *47*, 363–375.
- [201] Rensing, K.L.; Abdallah, H.M.; Koek, A.; Elmowalid, G.A.; Vandenbroucke-Grauls, C.M.; Al Naiemi, N.; van Dijk, K. Prevalence of plasmid-mediated AmpC in *Enterobacteriaceae* isolated from humans and from retail meat in Zagazig, Egypt. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* **2019**, *8*, 1–8.
- [202] Jeon, H.Y.; Kim, Y.B.; Lim, S.K.; Lee, Y.J.; Seo, K.W. Characteristics of cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates from poultry in Korea, 2010–2017. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 957–965.
- [203] Hryniewicz, W. Eksperckie zasady interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów – zalecenia EUCAST. Wersja 2.0. Publikacja on-line: <https://korld.nil.gov.pl/rekomendacje/zespol-roboczy-ds-eucast/> (dostęp w dniu 23.09.2023 r.).
- [204] Richter, L.; Du Plessis, E.M.; Duvenage, S.; Korsten, L. Occurrence, identification, and antimicrobial resistance profiles of extended-spectrum and AmpC-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from fresh vegetables retailed in Gauteng province, South Africa. *Foodborne Pathog. Dis.* **2019**, *16*, 421–427.
- [205] Vincenti, S.; Raponi, M.; Sezzatini, R.; Giubbini, G.; Laurenti, P. *Enterobacteriaceae* antibiotic resistance in ready-to-eat foods collected from hospital and community canteens: analysis of prevalence. *J. Food Protect.* **2018**, *81*, 424–429.
- [206] Łobocka, M.; Hejnowicz, M.S.; Gagala, U.; Weber-Dabrowska, B.; Węgrzyn, G.; Dadlez, M. The first step to bacteriophage therapy: how to choose the correct phage. In *Phage Therapy: Current Research and Applications*; Borysowski, J., Miedzybrodzki, R., Gorski, A., Eds.; Caister Academic Press: Norfolk, UK, 2018; pp. 23–67.
- [207] Oechslin, F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses* **2018**, *10*, 351.
- [208] Chan, B.K.; Abedon, S.T. Phage therapy pharmacology phage cocktails. *Adv. Appl. Microbiol.* **2012**, *78*, 1–23.
- [209] Hyman, P. Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. *Pharmaceuticals* **2019**, *12*, 35.
- [210] Ross, A.; Ward, S.; Hyman, P. More is better: selecting for broad host range bacteriophages. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1352.

- [211] Lin, D.M.; Koskella, B.; Lin, H.C. Phage therapy: an alternative to antibiotics in the age of multi–drug resistance. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **2017**, *8*, 162–173.
- [212] Mateus, C.; Costa, C.; Silva, Y.; Cunha, A.; Almeida, A. Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. *Aquaculture* **2014**, *424*, 167–173.
- [213] Abedon, S.T.; Herschler, T.D.; Stopar, D. Bacteriophage latent–period evolution as a response to resource availability. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 4233–4241.
- [214] Bailly-Bechet, M.; Vergassola, M.; Rocha, E. Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages. *Genome Res.* **2007**, *17*, 1486–1495.

