



dr hab. n. med. i n. o zdr. inż. AGATA STOBNIKA-KUPIEC
(ORCID: 0000-0003-1212-0651)

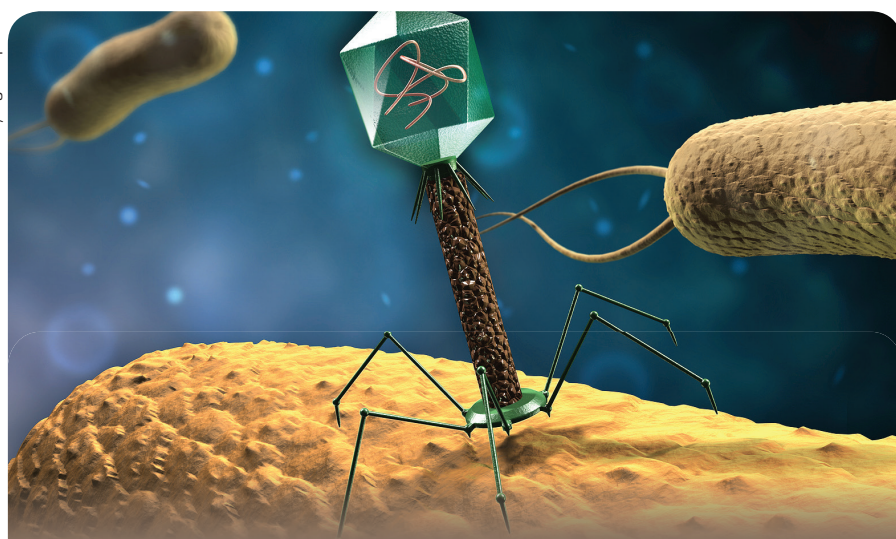
Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy

Kontakt: agsto@ciop.pl

DOI: 10.54215/BP.2024.10.22.Stobnicka-Kupiec

Bakteriofagi jako czynniki biokontroli populacji niepożądanych bakterii

Fot. Thufir/Bigstockphoto



Bakteriofagi, czyli wirusy atakujące bakterie, stanowią najliczniejszą grupę biologicznych form życia na Ziemi. Każdy gatunek bakterii posiada jeden lub wiele bakteriofagów, które stanowią naturalny czynnik regulujący liczebność ich populacji w przyrodzie. Specyfika oddziaływania fagów na bakterie czyni je obiecującą alternatywą dla przeciwbakteryjnych środków chemicznych przy zwalczaniu bakterii patogennych i niepożądanych, w tym szczepów biofilmotwórczych czy opornych na antybiotyki. Zdolność bakteriofagów do kontrolowania populacji bakterii spowodowała, że znajdują one zastosowanie w różnych sektorach gospodarki, w tym w medycynie i weterynarii, rolnictwie, akwakulturach, oczyszczaniu ścieków, przemyśle spożywczym, a także jako bioindykatory zanieczyszczenia mikrobiologicznego. Obiecującym rozwiązaniem może być także zastosowanie bakteriofagów do eliminacji patogennych bakterii w środowisku pracy, co pozwoli zmniejszyć zagrożenie ze strony szkodliwych czynników biologicznych.

Słowa kluczowe: bakteriofagi, biokontrola, bakterie patogene

Bacteriophages as biocontrol agents of undesirable bacteria populations

Bacteriophages, i.e. viruses that attack bacteria, are the largest group of biological life forms on Earth. Every species of bacteria has one or more bacteriophages, which act as a natural regulator of their population in environment. The specific way in which phages interact with bacteria makes them a promising alternative to antibacterial chemicals in controlling pathogenic and unwanted bacteria, including biofilm-producing strains or antibiotic-resistant ones. The ability of bacteriophages to control bacterial populations has led to their use in medicine, veterinary medicine, agriculture, aquaculture, wastewater treatment, the food industry, and as bioindicators of microbiological pollution. A promising solution could be the use of bacteriophages to eliminate pathogenic bacteria in the occupational environment, which would reduce the risk posed by harmful biological agents.

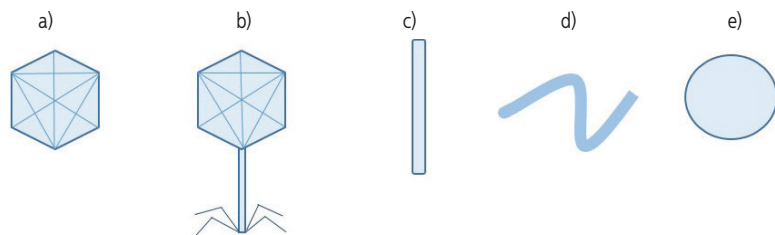
Keywords: bacteriophages, biocontrol, pathogenic bacteria

Wstęp

Bakteriofagi, zwane również fagami, są wirusami organizmów prokariotycznych i stanowią najliczniejszą grupę biologicznych form życia na Ziemi [1]. Bakteriofagi występują zarówno w wodach słodkich, jak i w wodach słonych, a także w glebie czy ściekach. Mogą naturalnie występować w niektórych pokarmach i organizmie człowieka, np. w jelitach [2]. Stanowią najbardziej zróżnicowaną i prawdopodobnie najliczniejszą grupę wirusów [3]. Fagi zostały odkryte w 1915 r. przez Fredericka Williama Tworta, który wyizolował je z materiału biologicznego od pacjentów chorych na czerwone i opisał jako wirusy, które mają zdolność pasytywowania na bakteriach [4]. Bakteriofagi różnią się znacznie między sobą pod względem morfologii i właściwości replikacyjnych. Jako materiał genetyczny zawierają RNA (kwas rybonukleinowy) lub DNA (kwas deoksyrybonukleinowy) i to właśnie rodzaj materiału genetycznego oraz stopień identyczności sekwencji genomowych stanowią obecnie parametry stosowane przez Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ICTV¹) do klasyfikacji bakteriofagów [5–7].

Wszystkie fagi, podobnie jak inne wirusy, składają się z cząsteczki kwasu nukleinowego (genomu) otoczonego płaszczem białkowym (kapsydem). W skład genomu może wchodzić jedno- lub dwuniciowy RNA lub DNA. Kapsydy mogą przyjmować różne kształty – od małych sześciokątnych struktur przez formę włókien po wysoce złożone struktury, składające się z głowy i ogona (zob. rys.). Bakteriofagi można podzielić na dwie grupy: zjadliwe i łagodne. Te zjadliwe namnażają się i zabijają komórki bakterii, łagodne natomiast wbudowują się w materiał genetyczny komórki bakteryjnej i mogą istnieć przez wiele jej pokoleń, przy czym fagi zjadliwe i łagodne mogą być tym samym fagiem różnicowanym przez czynniki biotyczne. Tak jak wirusy organizmów eukariotycznych fagi nie wykazują cech organizmów żywych, a namnażać się mogą jedynie po wnikięciu do komórek gospodarza [8].

¹ International Committee on Taxonomy of Viruses.



Rys. Schematyczna budowa morfologiczna bakteriofagów: a) wielościan, b) wielościan z ogonkiem, c) kształt włóknisty, d) kształt nitkowaty, e) kształt sferyczny [7]

Fig. Schematic morphological structure of bacteriophages: a) polyhedron, b) polyhedron with a tail, c) fibrous shape, d) filamentous shape, e) spherical shape [7]

Namnażanie się bakteriofagów przebiega w efekcie różnych cykli replikacyjnych: litycznego, lizogenego, pseudolizogenego i chronicznego. Bakteriofagi lityczne (np. fagi T4 i MS2) wprowadzają swój materiał genetyczny do wnętrza bakterii, powodując wytworzenie w komórce dużej ilości kopii faga. Po replikacji błona komórkowa pęka i następuje uwolnienie nowych bakteriofagów. Bakteriofagi lizogenne (np. fag T1) wykorzystują alternatywny cykl, w którym wirus może zintegrować swoje DNA z genomem bakteryjnym, stając się niezakaźny i replikuje się razem z chromosomem bakterii; bakteriofag staje się wtedy tzw. profagiem, a wytwarzanie nowych cząstek bakteriofaga może przebiegać w odpowiednich warunkach, np. pod wpływem oddziaływania światła UV. W stanie pseudolizogenii obserwuje się brak integracji genomu bakteriofaga z genomem gospodarza. Bakteriofagi pseudolizogenne wywołują ciągłą infekcję, a ekspresja genów zachodzi tylko w części populacji. W przypadku cyklu chronicznego (charakterystycznego np. dla faga M13) fag zachowuje swój genom w komórce bakteryjnej, a uwolnienie następuje stopniowo z mniejszym uszkodzeniem komórki gospodarza [5].

Celem niniejszego artykułu jest omówienie oddziaływania bakteriofagów na komórki bakteryjne (w tym komórki tworzące biofilmy), a także przedstawienie biokontroli populacji bakterii niepożądanych jako alternatywy dla stosowania antybiotyków i środków bakteriobójczych w różnych gałęziach gospodarki ze wskazaniem ograniczeń w przygotowaniu i stosowaniu preparatów bakteriofagowych. Wykorzystanie bakteriofagów do zwalczania patogennych bakterii może się przyczynić do ograniczenia narażenia pracowników na szkodliwe czynniki biologiczne oraz chemiczne środki przeciwbakteryjne i tym samym – do poprawy warunków pracy.

Oddziaływanie na biofilmy jako mechanizm przeciwbakteryjnej aktywności bakteriofagów

W naturze większość bakterii występuje w postaci biofilmu, który jest utworzony przez wielokomórkowe, zorganizowane skupisko drobnoustrojów, otoczone wydzielanymi przez siebie polimerami, określanymi jako EPS (ang. *extracellular polymeric substances*). Należą do nich polisacharydy, białka oraz zewnątrzkomórkowy

kwas deoksurybonukleinowy (eDNA). EPS tworzy macierz biofilmu, która utrzymuje wszystkie komórki w skupisku i tworzy barierę ochronną przed czynnikami środowiska [9]. W strukturze biofilmu można wyróżnić odrębne subpopulacje komórek, których rozwój jest determinowany przez odmienne warunki środowiska. Podstawowe znaczenie w tym procesie ma zmniejszająca się wraz z odległością od powierzchni biofilmu ilość tlenu i składników odżywczych. W biofilmie mogą występować cztery subpopulacje komórek różniących się aktywnością metaboliczną. Są to komórki: rosnące w warunkach tlenowych, rosnące w warunkach beztlenowych (fermentujące), będące w stanie uśpienia (w tym komórki bardzo wolno rosnące i przetrwałe – tzw. persister) oraz martwe. Subpopulacja komórek persister jest genetycznie identyczna z pozostałymi komórkami biofilmu, jednak – co bardzo istotne – różni się od nich wysoką tolerancją na antybiotyki, ze względu na spowolnione tempo podziałów komórkowych lub ich całkowity brak [10].

Struktura biofilmu zabezpiecza bakterie przed wieloma czynnikami środowiska, takimi jak: promieniowanie UV, toksyczne metale, działanie kwasów, odwodnienie i zasolenie, fagocytoza oraz działanie antybiotyków i środków antybakteryjnych. Liczne badania potwierdzają, że drobnoustroje występujące w postaci biofilmu wykazują brak wrażliwości na antybiotyki, nawet gdy planktoniczne postaci tego samego drobnoustroju są na dany antybiotyk wrażliwe. W przypadku niektórych antybiotyków minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii (MIC) i minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) wobec bakterii tworzących biofilm może być nawet 1000-krotnie wyższe niż dla form planktonicznych [11].

Wyodrębnia się następujące mechanizmy działania bakteriofagów na komórki drobnoustrojów tworzących biofilm, które znacznie się różnią od działania substancji chemicznych, w tym antybiotyków czy środków dezynfekcyjnych:

- replikację bakteriofagów w komórkach bakterii, powodującą miejscowe zwiększenie ich liczby. Po rozpadzie komórki bakteryjnej nowe cząstki faga rozprzestrzeniają się w strukturze biofilmu i, eliminując kolejne komórki bakteryjne, stopniowo usuwają biofilm oraz zmniejszają jego potencjał regeneracyjny;
- mechanizm oparty na działaniu enzymów (depolimeraz), które niszczą integralność EPS,

pozwalając cząstkom faga na uzyskanie dostępu do ukrytych w głębi biofilmu komórek bakteryjnych. Bakterie stają się wówczas bardziej podatne na działanie antybiotyków lub naturalnych mechanizmów obronnych gospodarza [9].

Bakteriofagi jako czynniki biokontroli bakterii niepożądanych

Biokontrola polega na wprowadzeniu specyficznych organizmów (często drapieżników lub pasożytów) do ekosystemów (np. pól uprawnych) w celu zwalczania gatunków, które stały się szkodnikami. Biokontrola za pośrednictwem bakteriofagów sprowadza się zatem do redukcji lub eliminacji bakterii niepożądanych lub patogennych. Co ważne, fagi mogą być wykorzystane do zwalczania nawet wielolekoopornych bakterii – zarówno występujących w postaci planktonicznej, jak i komórek bytujących w biofilmie, w tym komórek przetrwałych. Wśród zalet bakteriofagów należy także wymienić: stosunkowo tanie i szybkie metody ich wytwarzania, możliwość modyfikacji genetycznej, możliwość łączenia z innymi preparatami czy środkami antybakteryjnymi oraz różnorodność dawkowania. W biokontroli zastosowanie znajdują zarówno preparaty bakteriofagowe zawierające aktywne fagi gotowe do namnażania, jak i preparaty zawierające wyekstrahowane aktywne białka fagowe [12].

Zastosowanie bakteriofagów w medycynie i weterynarii

Terapia fagowa (fagoterapia) polega na zastosowaniu bakteriofagów w leczeniu infekcji bakteryjnych u ludzi i zwierząt w celu zmniejszenia liczebności lub eliminacji z organizmu bakterii patogennych. Bakteriofagi mają wiele cech, dzięki którym mogą być wykorzystywane jako alternatywa dla antybiotyków w terapii zakażeń bakteryjnych. Podstawową z tych cech jest zdolność do infekowania wyłącznie komórek bakteryjnych, gdyż ze względu na brak odpowiednich receptorów bakteriofagi nie są w stanie przyłączyć się do komórek ludzkich czy zwierzęcych. Preparaty bakteriofagowe mogą być podawane miejscowo, doustnie, bezpośrednio do chorych tkanek lub ogólnoustrojowo. Bakteriofagi koncentrują się w miejscu infekcji i wykładniczo zwiększają swoją liczbę. Co ważne, wraz ze zwiększaniem się liczby bakterii wzrasta również liczba bakteriofagów. Pozwala to na uzyskanie optymalnego efektu terapeutycznego bez konieczności wielokrotnego dawkowania fagów. Natomiast w chwili zniszczenia komórek niepożądanych bakterii liczba fagów zaczyna spadać, aż do ich usunięcia z ustroju. W przeciwieństwie do bakteriofagów utrzymanie odpowiednio wysokiego i terapeutycznie skutecznego stężenia antybiotyków w organizmie wymaga podawania kolejnych dawek z uwagi na przebiegające procesy metaboliczne [13].

Tabela 1. Przykłady zastosowania terapii fagowej u ludzi i zwierząt oraz uzyskane efekty terapeutyczne
Table 1. Examples of the use of phage therapy in humans and animals and the therapeutic effects obtained

Czynnik chorobotwórczy	Gospodarz	Jednostka chorobowa	Droga podania preparatu fagowego	Efekt terapeutyczny
<i>Shigella dysenteriae</i>	człowiek	czerwonka	doustnie	ustąpienie objawów choroby u wszystkich leczonych pacjentów po 24 h
<i>Vibrio cholerae</i>	człowiek	cholera	doustnie	ustąpienie objawów choroby u 93% leczonych pacjentów
Wielolekooporny szczep <i>Staphylococcus aureus</i>	człowiek	stopa cukrzycowa	powierzchniowo	wszyscy leczeni pacjenci uzyskali poprawę
Oporny na antybiotyki szczep <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	człowiek	chroniczne zapalenie ucha	doustnie	objawy złagodzone u pacjentów leczonych preparatem fagowym
<i>Streptococcus mutans</i>	człowiek	kamień nązębny, próchnica	doustnie	redukcja kamienia nązębnego
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	mysz	sepsa	doustnie	redukcja śmiertelności (67%)
<i>Escherichia coli</i>	mysz	zapalenie opon mózgowych, sepsa	iniekcja dootrzewnowa lub podskórna	redukcja śmiertelności dla zapalenia opon mózgowych i sepsy (100% i 50%)
<i>Aeromonas</i> spp.	ryby	sepsa	iniekcja dootrzewnowa	redukcja śmiertelności (100%)
<i>Lactococcus garvieae</i>	ryby	zmiany w śródbłonku naczyń krwionośnych, krwotoki	iniekcja dootrzewnowa	redukcja śmiertelności (100%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	królik	zakażenie ran	iniekcja podskórna	zapobieganie rozwojowi infekcji
<i>Clostridium difficile</i>	chomik	zapalenie jelita krętego	doustnie co 8 h przez 72 h	redukcja śmiertelności (92%)
<i>Campylobacter</i> spp.	drób	kampylobakterioza	doustnie (dodatek paszowy)	prewencja zakażeń horyzontalnych
<i>Salmonella</i> Enteritidis	drób	salmonelloza	doustnie (dodatek paszowy)	prewencja zakażeń horyzontalnych
<i>Escherichia coli</i>	bydło mleczne	zapalenie wymion	powierzchniowo	prewencja zakażenia

Charakterystyczną cechą bakteriofagów jest ich swoistość, co oznacza, że ograniczają one swoje działania do określonego gatunku, a czasami nawet szczepu bakterii. Dzięki tej właściwości nie wpływają na fizjologiczną mikrobiotę², co zmniejsza ryzyko rozwoju wtórnych zakażeń, często związanych z leczeniem antybiotykami [14]. Dodatkowo istotnym problemem związanym ze stosowaniem antybiotyków jest postępująca oporność bakterii na tego typu środki lecznicze. W przypadku bakteriofagów problem ten nie jest tak znaczący ze względu na mutacje zachodzące w genomie faga, które umożliwiają łatwiejszą adaptację wirusa do zmienionych komórek bakterii. Co więcej, zakres działania bakteriofagów jest wąski i obejmuje jeden, a rzadziej kilka rodzajów bakterii, dzięki czemu bakterie odporne na jeden rodzaj fagów pozostają podatne na inne o podobnym działaniu. Preparaty fagowe podawane są często w postaci tzw. koktajli fagowych, które stanowią odpowiednik terapii wielolekowych – w ten sposób potencjalna oporność bakterii na jeden rodzaj faga nie wpływa na skuteczność całej terapii. Kluczową cechą bakteriofagów w mechanizmach biokontroli bakterii patogennych w medycynie i weterynarii jest zdolność fagów do łączenia się z receptorami bakteryjnymi ważnymi w procesie patogenezы, dzięki czemu

zdolności adaptacyjne bakterii do warunków środowiska, a w niektórych przypadkach wirulencja (zjadliwość) bakterii, mogą ulec drastycznemu osłabieniu [14]. W przypadku zastosowania preparatów fagowych u ludzi nie istnieją obecnie żadne regulacje dotyczące bakteriofagów na poziomie prawodawstwa europejskiego. Dotychczas Europejska Agencja Leków (EMA) zasugerowała jedynie, że niektóre zasady zawarte w „Wytycznych dotyczących oceny produktów leczniczych wskazanych do leczenia infekcji bakteryjnych” można zastosować także w przypadku preparatów fagowych. Jak dotąd nie istnieje jednak żaden produkt leczniczy na bazie fagów do stosowania u ludzi, zatwierdzony na mocy prawa UE. Jedynie na Słowacji i w Czechach dostępny jest na rynku produkt leczniczy o nazwie Stafal® [15]. Preparat ten wprowadzono na rynek przed przystąpieniem tych państw do UE. Kraje, które stosują obecnie terapię fagową, prowadzą ją w ramach badań eksperymentalnych lub badań klinicznych. W takich przypadkach stosuje się preparaty przygotowywane indywidualnie lub importowane z krajów pozaeuropejskich, np. z Gruzji, gdzie terapia fagowa jest rozwijana i stosowana od blisko 100 lat. W Polsce, Belgii, we Francji i w Niemczech prowadzi się badania w celu zastosowania terapii fagowej jako standardowego leczenia infekcji bakteryjnych [16].

Ciekawym aspektem związanym z wykorzystaniem bakteriofagów w medycynie jest możliwość ich stosowania w diagnostyce medycznej. Otrzymane w drodze inżynierii genetycznej, zmodyfikowane bakteriofagi zyskują nowe

właściwości, np. selektywnie wiążą białka. Dzięki temu mogą być użytkowane jako „elementy rozpoznawcze” w biosensorach. Zastosowanie takich bakteriofagów może zaowocować opracowaniem innowacyjnych czujników, które zrewolucjonizują bioanalitikę i poprawią jakość usług medycznych. Pociąga to za sobą możliwość zastosowania bakteriofagów lub peptydów pochodzenia bakteriofagowego jako nowych elementów czujnikowych do rozpoznawania biomarkerów wielu chorób i budowy wysoce skutecznych narzędzi diagnostycznych [17].

Przykłady zastosowania eksperymentalnych terapii fagowych u ludzi i zwierząt, wraz ze wskazaniem drogi podania preparatu i uzyskanym efektem terapeutycznym, przedstawiono w tab. 1 [3, 14, 18].

Zastosowanie bakteriofagów w przemyśle spożywczym

Biorąc pod uwagę bezpieczeństwo żywności i aspekt zdrowia publicznego, należy zauważyć, że epidemie związane z infekcjami bakteryjnymi przenoszonymi przez żywność mogą wystąpić także w sytuacji przestrzegania dobrych praktyk higienicznych. Bakterie mogące zanieczyszczać linie technologiczne w przemyśle spożywczym często są zdolne do agregacji na różnorodnych powierzchniach maszyn i urządzeń produkcyjnych, w tym wykonanych z polistyrenu, ze stali nierdzewnej czy z teflonu [19].

² Ogół mikroorganizmów (bakterii, archeonów, grzybów, pierwotniaków, drożdży, wirusów) żyjących w określonym środowisku, zasiedlających organizm gospodarza zwierzęcego lub rośliny.

Tabela 2. Zastosowanie bakteriofagów w przemyśle spożywczym do usuwania biofilmów bakterii patogennych
Table 2. The use of bacteriophages in the food industry to remove biofilms of pathogenic bacteria

Bakteria	Bakteriofag/ białko fagowe	Rodzaj powierzchni	Skuteczność działania
<i>Listeria monocytogenes</i>	fag P100	stal nierdzewna	redukcja liczby komórek biofilmu do niewykrywalnego poziomu po 48 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	fag K	polistyren	całkowita eliminacja biomasy bakterii po 72 h inkubacji
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	koktajl fagowy BEC8	stal nierdzewna, powierzchnie ceramiczne, polietylen	redukcja liczby komórek biofilmu do niewykrywalnego poziomu po 1 h inkubacji w temperaturze 37°C, 23°C i 12°C
<i>Campylobacter jejuni</i>	fag CP8 i CP30	szkło	redukcja liczby komórek biofilmu o 1–3 cykle logarytmiczne/cm²
<i>Staphylococcus aureus</i>	endolizyna faga phi11	polistyren	całkowita eliminacja biomasy bakteryjnej po 2 h inkubacji w temperaturze 37°C
<i>Salmonella Typhimurium</i>	endolizyna Lys68	polistyren	redukcja liczby komórek biofilmu po 2 h inkubacji z zastosowaniem środków zwiększających przepuszczalność błony zewnętrznej komórek bakterii

Tabela 3. Zastosowanie preparatów bakteriofagowych w ochronie upraw warzyw i owoców
Table 3. The use of bacteriophage preparations in the protection of vegetable and fruit crops

Roślina	Patogen bakteryjny	Choroba	Bakteriofag	Efekt działania
Wiśnia (liście)	<i>Pseudomonas syringae</i>	bakteryjna zgnilizna liści	bakteriofagi MR6, MR8, MR15, MR16	redukcja liczby zainfekowanych roślin o 20–100% w czasie 1–5 tygodni stosowania
Ziemniak	<i>Pectobacterium</i> spp.	zgnilizna bulw	bakteriofag ΦPD10.3 i ΦPD23.1	redukcja liczby zainfekowanych bulw o 80–95%
Limonka meksykańska (liście)	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	zmiany martwicze drzew cytrusowych	koktajl bakteriofagowy	redukcja liczby zainfekowanych roślin o 55%
Ziemniak	<i>Ralstonia solanacearum</i>	bakteryjne wędnięcie liści	koktajl bakteriofagowy P1	prewencja zakażenia

Analiza drobnoustrojów wchodzących w skład biofilmów na powierzchniach urządzeń stosowanych w przetwórstwie żywności wykazała, że w biofilmach mogą występować jednocześnie zarówno bakterie patogenne, jak i szczepy wpływające na psucie się żywności. Mikroorganizmy te mogą trafić na linię produkcyjną wraz z surowcem czy wodą i powodować zanieczyszczenie linii produkcyjnej przez długi czas. W związku z tym produkty spożywcze mogą ulec skażeniu na każdym etapie produkcji. Trzeba podkreślić, że ze względu na tendencje bakterii do tworzenia biofilmów procedury czyszczenia i dezynfekcji w przemyśle spożywczym często są nieskuteczne, zwłaszcza w stosunku do bakterii opornych na tego typu procesy. Powstawanie szczególnie trudnych do usunięcia biofilmów obserwuje się w przemyśle mleczarskim i mięsny oraz w przetwórstwie warzyw [8]. Z drugiej strony, w przemyśle mleczarskim dziko występujące bakteriofagi mogą niszczyć kultury starterowe używane w produkcji jogurtów czy serów [20].

Potencjał zastosowania bakteriofagów w przemyśle spożywczym jest tak duży, że dostępne są komercyjne produkty oparte na fagach, ukie­runkowane na konkretne patogeny przenoszone przez żywność, które można wykorzystać jako środki dezynfekujące do powierzchni oraz produkty pomocnicze w przetwórstwie żywności. Wśród tego typu produktów można wymienić np.: BacWash™, SalmoFresh™; Salmo­nelex™ – przeciwko szczepom *Salmonella*, EcoShield™, Finalyse™ – przeciwko szczepom patogennym *Escherichia coli* O157:H7 oraz Listex™, ListShield™ – przeciwko *Listeria monocytogenes*. Preparaty tego typu są stosowane jako biokonserwanty zarówno w przetwórstwie produktów zwierzęcych (np. w przypadku serów z mleka surowego, wędzonego łososia, surowego mięsa, owoców morza), jak i roślinnych (np. w przypadku gotowych miksów sałat, kiełków, sałatek owocowych, truskawek). Amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA³)

³ Food and Drug Administration.

zatwierdziła użycie kilku produktów na bazie fagów w produkcji żywności – nadając im status GRAS⁴ – do zastosowania zarówno jako biokonserwanty żywności, jak i środki dezynfekujące powierzchnie mające kontakt z produktami spożywczymi. Europejska Agencja do spraw Bezpieczeństwa Żywności (EFSA⁵) zaaprobowала jeden preparat bakteriofagowy jako dodatek paszowy dla zwierząt – mowa tu o preparacie Bafasal® stosowanym jako dodatek paszowy dla wszystkich gatunków ptaków [19, 21].

Możliwości zastosowania bakteriofagów w przemyśle spożywczym w procesach usuwania biofilmów bakterii patogennych z różnorodnych powierzchni przedstawiono w tab. 2 [22, 23].

Zastosowanie bakteriofagów w rolnictwie

Istotnym problemem w rolnictwie jest występowanie bakterii patogennych, tzw. fitopatogenów, które atakują rośliny uprawne oraz przyczyniają się do szkód rolniczych i znacznego ograniczenia zbiorów. Według fitopatologów najważniejszymi patogenami bakteryjnymi roślin są bakterie: *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas* spp., *Erwinia amylovora*, *Xylella fastidiosa*, *Dickeya* spp. i *Pectobacterium* spp. [24]. Mimo że obecnie istnieje wiele strategii ochrony roślin przed fitopatogenami, narastająca oporność tych szczepów na środki przeciwbakteryjne, jak również oczekiwania konsumentów poszukujących żywności pochodzącej z upraw zrównoważonych i ekologicznych pociągają za sobą konieczność poszukiwania naturalnych alternatyw dla środków chemicznych, w tym opartych na aktywnych bakteriofagach [24]. Tego typu preparaty mogą być aplikowane jako opryski lub doglebowo. Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (EPA⁶) zezwoliła na stosowanie produktu fagowego o nazwie AgriPhage™, który może być używany komercyjnie do zapobiegania infekcjom młodych roślin pomidora i papryki przez *Pseudomonas syringae*. W 2018 r. EPA zatwierdziła również Agriphage-Citrus cancer™ jako biologiczną kontrolę do stosowania przeciwko *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, który powoduje zmiany martwicze na liściach, łodygach i owocach drzew cytrusowych. Ponadto EPA zatwierdziła inne zawierające bakteriofagi produkty o nazwach Agriphage CMM™ i Agriphage-Fireblight – stosowane przeciwko *Clavibacter michiganensis* (powodującej chorobę krzewów pomidora) i *Erwinia amylovora* (powodującej zarazę ogniową jabłek i gruszek). Przykłady zastosowania preparatów bakteriofagowych w ochronie upraw warzyw i owoców przedstawiono w tab. 3 [25].

⁴ Ang. generally recognized as safe.
⁵ European Food and Safety Authority.
⁶ Environmental Protection Agency.

Zastosowanie bakteriofagów w procesach oczyszczania ścieków

Bakteriofagi mogą również znaleźć zastosowanie w procesach oczyszczania ścieków. Skuteczność oczyszczania ścieków surowych, trafiających do oczyszczalni, jest bardzo istotna z punktu widzenia zdrowia publicznego oraz wpływu na ekosystemy wodne środowiska naturalnego. Ścieki surowe stanowią mieszaninę ścieków komunalnych (bytowych), przemysłowych (np. z ferm zwierzęcych) i szpitalnych oraz wód opadowych i mogą zawierać zarówno bakterie patogenne, saprofityczne, odpowiadające za powstawanie piany utrudniającej procesy technologiczne oczyszczania, jak i tworzące biofilmy na powierzchniach urządzeń. Co ważne, wśród bakterii występujących w ściekach często obecne są szczepy odporne na antybiotyki i środki bakteriobójcze. Interakcja między bakteriofagami a bakteriami odgrywa ważną rolę w utrzymaniu prawidłowego procesu oczyszczania ścieków. Odpowiednio dobrane preparaty bakteriofagowe mogą być również pomocne w usuwaniu bakterii patogennych, w tym antybiotykoopornych. Zastosowanie bakteriofagów pozwala na bezpieczne odprowadzenie ścieków oczyszczonych do środowiska, w tym do naturalnych zbiorników wodnych. Z uwagi na ukierunkowane działanie bakteriofagów nie wpływają one negatywnie na bakterie zaangażowane w biologiczne procesy oczyszczania. Jako przykład można podać ograniczenia tworzenia piany przez bakterie *Haliscomenobacter hydrossis*, bez wpływu na usuwanie przez nie składników odżywczych, przy jednoczesnej poprawie właściwości osadzania się osadu [26].

Bakteriofagi jako alternatywa dla środków dezynfekcyjnych w środowisku pracy

Tradycyjne metody dezynfekcji powierzchni w środowisku pracy opierają się przede wszystkim na stosowaniu chemicznych środków przeciwdrobnoustrojowych. Stosowanie tego typu preparatów sprawia, że pojawiają się szczepy bakterii odporne na działanie biocydów. Proces narastania oporności postępuje szybciej u bakterii Gram-ujemnych, co jest związane z występowaniem u tych bakterii zewnętrznej błony, która stanowi barierę dla środka dezynfekcyjnego i pozwala przeżyć komórkom bakterii w obecności subletalnych dawek preparatu. Dodatkowo szczepy odporne mogą wytwarzać bariery strukturalne, m.in. poprzez zwiększenie syntezy lipidów, przez co skutecznie uszczelniają błonę cytoplazmatyczną, a co za tym idzie – utrudniają kontakt preparatu z wnętrzem komórki. Biocydy powodują zniszczenie form wrażliwych bakterii, a formy odporne rozwijają się, tworząc populację niewrażliwą na zastosowane środki dezynfekcyjne. Częstym zjawiskiem jest tzw. oporność krzyżowa bakterii na preparaty dezynfekcyjne i antybiotyki,

która charakteryzuje się całkowitą lub częściową niewrażliwością bakterii na grupy preparatów należących do tej samej lub pokrewnej klasy chemicznej, w których substancją czynną jest związek o tej samej lub podobnej strukturze [27].

Biologiczne preparaty bakteriofagowe, bezpieczne dla człowieka, pozwoliłyby ograniczyć stosowanie chemicznych środków bakteriobójczych [28]. Perspektywa udoskonalenia oraz zwiększenia bezpieczeństwa i skuteczności biologicznych środków przeciwbakteryjnych daje także nadzieję na poprawę bezpieczeństwa pracowników poprzez ograniczenie narażenia na czynniki biologiczne i chemiczne.

Ograniczenia w produkcji i aplikacji preparatów bakteriofagowych

Pierwszym krokiem w pozyskaniu bakteriofagów mających potencjalne zastosowanie w przemyśle lub medycynie jest ich izolacja ze ścieków, z osadów ściekowych lub gleby. Kolejnym etapem jest wykazanie swoistości danego bakteriofaga w stosunku do danego szczepu bakteryjnego. Proces ten jest dość skomplikowany, ponieważ zdolność lityczna bakteriofagów może się różnić w zależności od wzajemnych relacji między bakteriofagami a bakteriami oraz od stężenia bakteriofagów w stosowanym preparacie fagowym. Co więcej, docelowy szczep bakterii może rozwinać oporność na dane bakteriofagi. Poważnym wyzwaniem bywa pozyskanie bakteriofaga, którego genom nie zawierałby niepożądanych genów. Istotnym aspektem jest także utrzymanie aktywności bakteriofagów w gotowych preparatach. Efektem niepożądanym przy stosowaniu preparatów bakteriofagowych może być nabywanie przez bakteriofagi genów oporności na antybiotyki oraz możliwość ich przenoszenia na bakterie [29].

Podsumowanie

Zdolność bakteriofagów do selektywnego eliminowania określonych szczepów bakterii przy jednoczesnym pozostawieniu pożytecznych lub saprofitycznych mikroorganizmów w nienaruszonym stanie czyni je obiecującą alternatywą dla tradycyjnych środków przeciwdrobnoustrojowych, stosowanych w różnych gałęziach gospodarki. Istotne znaczenie ma oddziaływanie bakteriofagów na bakterie antybiotykooporne i biofilmotwórcze, których zwalczanie jest szczególnie problematyczne. W kontekście ochrony człowieka w środowisku pracy bakteriofagi mogą być wartościowym narzędziem w zwalczaniu patogennych bakterii, zwłaszcza tych opornych na stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe. To zaś może się przyczynić do zapewnienia bardziej higienicznych i bezpiecznych warunków pracy – poprzez ograniczenie narażenia nie tylko na szkodliwe czynniki biologiczne, lecz także na chemiczne środki przeciwbakteryjne.

BIBLIOGRAFIA

- [1] SUTTLE C.A. Virus in the sea. *Nature*. 2005, 437: 356–361; doi: 10.1038/nature04160.
- [2] ROHWER F. Global phage diversity. *Cell*. 2003, 113: 141; doi: 10.1016/S0092-8674(03)00276-9.
- [3] MIRSKI T. i in. Bacteriophages, phage endolysins and antimicrobial peptides – the possibilities for their common use to combat infections and in the design of new drugs. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2019, 26(2): 203–209.
- [4] TWORT F.W. An investigation of the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet*. 1915, 186: 1241–1243; doi: 10.1016/S0140-6736(01)20383-3.
- [5] ROGOVSKI P. et al. Uses of Bacteriophages as Bacterial Control Tools and Environmental Safety Indicators. *Frontiers in Microbiology*. 2021, 12: 793135; doi: 10.3389/fmicb.2021.793135.
- [6] TURNER D., KROPINSKI A.M., ADRIAENSSENS E.M. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses*. 2021, 18, 13(3), 506; doi: 10.3390/v13030506.
- [7] DION M.B., OECHSLIN F., MOINEAU S. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*. 2020, 18: 125–138; doi: 10.1038/s41579-019-0311-5.
- [8] KOWALSKA M., SOKOŁOWSKA B. Wykorzystanie bakteriofagów w łańcuchu żywnościowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 2016, 4(107): 26–36; doi: 10.15193/zntj/2016/107/135.
- [9] ŁUBOWSKA N., PIECHOWICZ L. Biofilm *Staphylococcus aureus* i rola bakteriofagów w jego eradykacji. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2018, 72: 101–107; doi: 10.5604/01.3001.0011.5965.
- [10] JOHNSON P.J., LEVIN B.R. Pharmacodynamics, population dynamics, and the evolution of persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Genetics*. 2013, 9: e1003123.
- [11] HØIBY N. et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Science*. 2011, 3: 55–65.
- [12] CURTRIGHT A.J., ABEDON S.T. Phage therapy: emergent property pharmacology. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*. 2011, 56: 002.
- [13] GOODRIDGE L., ABEDON S.T. Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: Application of phage therapy to industry. 2007.
- [14] LIN D.M., KOSKELLA B., LIN H.C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. 2017, 8(3):162–173; doi: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162.
- [15] BOHEMIA PHARMACEUTICALS. STAFAL – Professional Community Information (EN). [Online:] http://avibep.org/wp-content/uploads/2019/10/Bohemia-Pharmaceuticals_-_Stafal-%E2%80%93-professional-community-information-EN.pdf [dostęp: 19.02.2024 r.].
- [16] FALTUS T. The Medicinal Phage-Regulatory Roadmap for Phage Therapy under EU Pharmaceutical Legislation. *Viruses*. 2024, 16(3): 443; doi: 10.3390/v16030443.

[17] MACHERA S.J., NIEDZIÓŁKA-JÖNSSON J., SZOT-KARPIŃSKA K. Phage-Based Sensors in Medicine: A Review. *Chemosensors*. 2020, 8(3): 61; doi: 10.3390/chemosensors8030061.

[18] HARADA L.K. et al. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*. 2018, 212–213: 38–58; doi: 10.1016/j.micres.2018.04.007.

[19] GUTIÉRREZ D. et al. Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7: 825; doi: 10.3389/fmicb.2016.00825.

[20] MANCINI A. et al. Massive Survey on Bacterial-Bacteriophages Biodiversity and Quality of Natural Whey Starter Cultures in Trentingrana Cheese Production. *Frontiers in Microbiology*. 2021, 12: 678012; doi: 10.3389/fmicb.2021.678012.

[21] BAMPIDIS V. et al. Safety and efficacy of a feed additive consisting on the bacteriophages PCMF/00069, PCMF/00070, PCMF/00071 and PCMF/00097 infecting *Salmonella* Gallinarum B/00111 (Bafasal®) for all avian species (Proton Pharmaceuticals S.A.). EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed

(FEEDAP). *EFSA Journal*. 2021, 19(5): e06534; doi: 10.2903/j.efsa.2021.6534.

[22] POŁASKA M., SOKOŁOWSKA B. Bacteriophages-a new hope or a huge problem in the food industry. *AIMS Microbiology*. 2019, 5(4): 324–346; doi: 10.3934/microbiol.2019.4.324.

[23] SCHMELCHER M., LOESSNER M.J. Bacteriophage endolysins: applications for food safety. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016, 37: 76–87; doi: 10.1016/j.copbio.2015.10.005.

[24] SVIRCEV A., ROACH D., CASTLE A. Framing the Future with Bacteriophages in Agriculture. *Viruses*. 2018, 10(5): 218; doi: 10.3390/v10050218.

[25] JAGANNATHAN B.V., DAKOSKE M., VIJAYAKUMAR P.P., Bacteriophage-mediated control of pre- and post-harvest produce quality and safety. *LWT*. 2022, 169: 113912; doi: 10.1016/j.lwt.2022.113912.

[26] RUNA V. et al. Bacteriophages in Biological Wastewater Treatment Systems: Occurrence, Characterization, and Function. *Frontiers in Microbiology*. 2021, 12: 730071; doi: 10.3389/fmicb.2021.730071.

[27] FUTOMA-KOŁOCH B., KSIAŻCZYK M. Oporność bakterii na środki dezynfekcyjne. *Laboratorium – Przegląd Ogólnopolski*. 2013, 9/10: 11–13.

[28] CHEN Z. et al. Effective elimination of bacteria on hard surfaces by the combined use of bacteriophages and chemical disinfectants. *Microbiology Spectrum*. 2024, 12: e03797-23; doi: 10.1128/spectrum.03797-23.

[29] PRINCIPI N., SILVESTRI E., ESPOSITO S. Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. *Frontiers in Pharmacology*. 2019, 10: 513; doi: 10.3389/fphar.2019.00513.

Opracowano i wydano na podstawie wyników VI etapu programu wieloletniego pn. „Rządowy Program Poprawy Bezpieczeństwa i Warunków Pracy” (projekt nr I.PN.01 pt. „Opracowanie metody biokontroli populacji bakterii w obróbkowych cieczach chłodzących stosowanych w przemyśle metalurgicznym za pomocą aktywnych bakteriofagów”), finansowanego w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Kierownik programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.



Chroń siebie i innych
Noś półmaskę

Ogólnopolska kampania społeczna mająca na celu poprawę świadomości w zakresie doboru oraz zasad stosowania półmasek filtrujących w życiu zawodowym i prywatnym



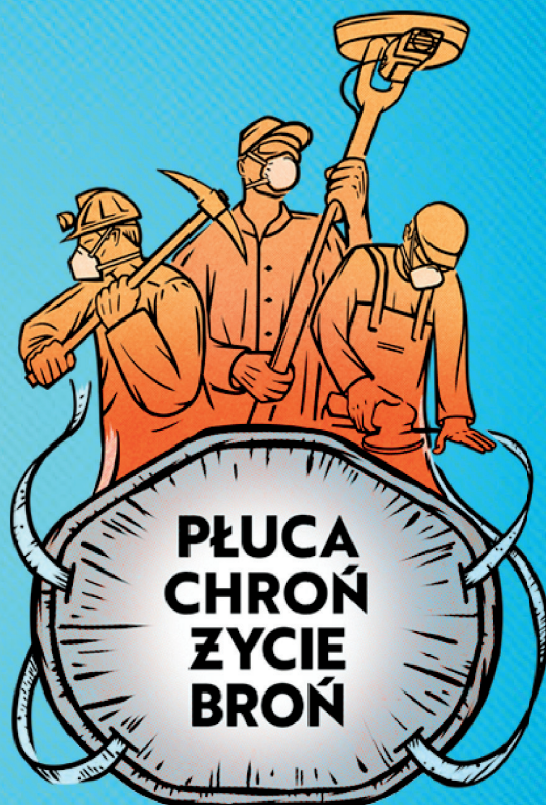
@nospolmaske



www.facebook.com/nospolmaske



www.ciop.pl/nos-polmaske



CIOP  PIB