

**„Morfologiczna i molekularna charakterystyka bakteriofaga vB\_Eco4M-7,  
wirulentnego wobec patogennych bakterii *Escherichia coli* O157:H7”**

**mgr Agnieszka Necel**

*Escherichia coli* to Gram-ujemne bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae*. Większość bakterii z tego gatunku stanowią niechorobotwórcze komensale, które występują w jelicie grubym człowieka oraz zwierząt stałocieplnych. Mikroorganizmy te odgrywają istotną rolę w trawieniu pokarmu, stanowią barierę ochronną przed rozwojem patogennych bakterii, a także uczestniczą w procesie syntezy witamin z grup B i K [1]. Należy podkreślić, iż niektóre szczepy *E. coli*, poprzez nabycie cech wirulencji na drodze horyzontalnego transferu genów, mogą stanowić przyczynę rozwoju wielu chorób u człowieka [2]. Przykładem takich patogennych bakterii są *E. coli* produkujące toksyny Shiga (ang. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC), wraz z najbardziej niebezpieczną podgrupą enterokrwotocznych szczepów *E. coli* (ang. enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) [3].

Głównym czynnikiem wirulencji bakterii STEC są toksyny Shiga. Białka te składają się z jednej podjednostki A oraz pięciu podjednostek B. Pierścień utworzony z podjednostek B odpowiedzialny jest za rozpoznanie receptora globotriaosyloceramidu (Gb3), zlokalizowanego na powierzchni błony komórek eukariotycznych. Na drodze endocytozy toksyna Shiga wnika do cytoplazmy komórki, następnie transportowana jest do aparatu Golgiego, skąd ulega retro-translokacji do retikulum endoplazmatycznego, gdzie aktywna katalitycznie podjednostka A zostaje odcięta przez proteazę od podjednostek B. Wówczas, podjednostka A uwolniona jest do cytoplazmy i tam dokonuje cięcia reszty adeniny w cząsteczce 28S rRNA, wchodzącej w skład budowy podjednostki 60S rybosomu. Taka modyfikacja prowadzi do zahamowania syntezy białek i śmierci komórki [4].

Warto nadmienić, że toksyny Shiga kodowane są przez geny *stx*, zlokalizowane w genomach bakteriofagów przenoszących geny toksyn Shiga (w skrócie fagi Stx). Te łagodne wirusy występują w bakteriach STEC w formie profagów. Podczas cyklu lizogenicznego ekspresja większości fagowych genów, w tym genów *stx*, jest wyciszona. Na skutek działania różnych czynników zewnętrznych, takich jak np. promieniowanie UV, EDTA, wysokie ciśnienie hydrostatyczne, niskie pH, nadtlenuk wodoru czy antybiotyków wiążących DNA, może dojść do indukcji profagów Stx. W konsekwencji tego procesu następuje wycięcie fagowego DNA z chromosomu bakteryjnego i rozpoczęcie przez wirusa cyklu litycznego. Na tym etapie rozwoju, poza ekspresją genów kodujących białka regulatorowe i strukturalne fagów, dochodzi do ekspresji genów *stx*. Wiąże się to z produkcją dużej ilości toksyn Shiga, które na skutek lizy komórek gospodarza warunkowanej przez fagi potomne uwalniane są do jelita. Następnie, toksyny Shiga docierają do światła naczyń krwionośnych, gdzie za pośrednictwem komórek krwi transportowane są do docelowych organów, głównie nerek i mózgu [4].

Zakażenie bakteriami STEC zwykle powoduje obfite biegunki, jak również krwotoczne zapalenie okrężnicy (ang. hemorrhagic colitis, HC), objawiające się krwawą biegunką, skurczami

żołądka oraz podwyższoną temperaturą ciała. Niestety, HC może prowadzić do rozwoju niebezpiecznych powikłań w postaci zespołu hemolityczno-mocznicowego (ang. haemolytic-uraemic syndrome, HUS). HUS jest schorzeniem charakteryzującym się triadą objawów: ostrą niewydolnością nerek, niedokrwistością hemolityczną i małopłytkowością. Choroba ta rozwija się u około 5-10% osób z infekcjami STEC, a towarzyszące jej długotrwałe następstwa zdrowotne sprawiają, że śmiertelność wśród pacjentów wynosi od 3% do 17%. Powikłania związane z rozwojem HUS są szczególnie niebezpieczne dla dzieci poniżej 5. roku życia oraz dla osób starszych, wśród których śmiertelność dochodzi nawet do 50% [5,6].

Niestety, obecnie nie są znane żadne skuteczne środki ani terapie skierowane przeciwko bakteriom STEC. Leczenie infekcji STEC jest niezwykle problematyczne, ponieważ wiele antybiotyków oraz chemioterapeutyków należy do grupy leków silnie indukujących profagi Stx. Podanie tego typu środków pacjentowi zakażonemu bakteriami STEC może przyczynić się do wzmożonej produkcji toksyn Shiga, a tym samym zaostrzyć objawy chorobowe. Ponadto, stosowanie środków przeciwbiegunkowych w zwalczaniu infekcji STEC jest również wysoce niewskazane. Środki te hamują bowiem perystaltykę jelit, a tym samym uniemożliwiają usunięcie patogennych bakterii z organizmu, prowadząc jednocześnie do zwiększenia stężenia toksyn Shiga w świetle jelita, co sprzyja rozwojowi HUS. Aktualnie bezpieczne leczenie infekcji STEC opiera się jedynie na podawaniu doustnych płynów nawadniających oraz dializach [7]. W związku z powyższym, istnieje konieczność poszukiwania nowych środków leczniczych oraz opracowania nowatorskich terapii, które byłyby skuteczne w zapobieganiu i zwalczaniu infekcji STEC.

Według doniesień Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) bakterie STEC zaliczane są na całym świecie do głównych przedstawicieli patogenów przenoszonych drogą pokarmową. Człowiek najczęściej zakaża się tymi bakteriami poprzez spożycie zanieczyszczonych odchodami zwierzęcymi warzyw i owoców, konsumpcję niedogotowanego mięsa mielonego, czy też wypicie niepasteryzowanego mleka. Do źródeł STEC zaliczyć można również wodę, nawozy organiczne oraz sprzęt wykorzystywany w masarniach do obróbki mięsa. Zasadniczo jednak, pierwszym ogniwem łańcucha transmisji tych patogenów do środowiska jest bydło i zwierzęta domowe, których przewód pokarmowy stanowi główne miejsce bytowania bakterii STEC. Co istotne, zwierzęta hodowlane są niewrażliwe na działanie toksyn Shiga, gdyż ich komórki naczyniowe nie posiadają receptorów Gb3. Należy również podkreślić, iż skażenie żywności bakteriami STEC przyczynia się nie tylko do wybuchu wielu lokalnych epidemii, ale również prowadzi do ogromnych strat ekonomicznych w przemyśle spożywczym [5,8]. W związku z powyższym, kluczowe wydaje się opracowanie skutecznych metod ochrony żywności przed skażeniem bakteriami STEC.

Z danych literaturowych wynika, iż zidentyfikowano dotąd ponad 100 serotypów bakterii STEC (np. O26, O55, O104, O111, O121, O145, O165, O174, O183), wśród których dominuje endemiczny szczep *E. coli* O157:H7 [8]. Znaczenie tego szczepu dla zdrowia publicznego dostrzeżono około 40 lat temu podczas wybuchu epidemii w Stanach Zjednoczonych Ameryki (ang. United States of America,

USA), której efektem był rozwój krwotocznego zapalenia okrężnicy u pacjentów, wywołany spożyciem hamburgerów skażonych bakteriami STEC [9]. Szacuje się, że od tego czasu w USA odnotowuje się rocznie ponad 60 000 zachorowań, w tym ponad 60 zgonów, spowodowanych skażeniami żywności przez bakterii *E. coli* o serotypie O157:H7, co w dużym stopniu obciąża finansowo sektory opieki zdrowotnej oraz gospodarki żywieniowej. Zakażenie bakteriami *E. coli* O157:H7 może prowadzić do wystąpienia krwawej biegunki, hospitalizacji, a także rozwoju HUS [10]. Wysoka zjadliwość tego serotypu warunkowana jest poprzez zdolność bakterii do produkcji toksyn Shiga oraz produktów kodowanych w obrębie wyspy patogennej i plazmidu pO157 [11]. Liczne badania wykazały również, że *E. coli* O157:H7 może tworzyć biofilmy na powierzchniach biotycznych (np. warzywa, mięso), jak i abiotycznych (np. stal nierdzewna, szkło) [12]. Biofilm jest definiowany jako społeczność mikroorganizmów otoczonych wyprodukowaną przez nie macierzą polisacharydów. Złożona struktura biofilmu chroni bakterie *E. coli* O157:H7 przed działaniem różnych czynników zewnętrznych, takich jak antybiotyki, czy też środki dezynfekujące stosowane w przemyśle spożywczym [13,14]. W związku z powyższym, pobudki zdrowotne i ekonomiczne stały się siłą napędową do poszukiwania skutecznych, niekonwencjonalnych oraz bezpiecznych strategii, które mogłyby posłużyć do zwalczania bakterii *E. coli* O157: H7, głównego przedstawiciela grupy STEC.

Jedną ze skutecznych strategii skierowanych przeciwko STEC może okazać się metoda oparta na zastosowaniu bakteriofagów (fagów) litycznych. Te wirusy bakteryjne uznawane są za najliczniejsze jednostki biologiczne w przyrodzie, które można spotkać w każdym środowisku (m.in. w ciele człowieka, wodzie, glebie). Bakteriofagi mogą infekować i replikować się wyłącznie w komórkach prokariotycznych. Co istotne, zdecydowana większość fagów wykazuje aktywność lityczną w stosunku do ściśle określonych gatunków bakterii, a nawet szczepów danego gatunku, dzięki czemu ryzyko zmian w składzie naturalnego mikrobiomu organizmu gospodarza jest bardzo niskie. Ponadto, bakteriofagi nie są aktywne wobec komórek ludzkich, w związku z czym mogą zostać uznane za bezpieczne [15]. Wszystkie te przesłanki sprawiły, iż w ostatnim czasie bakteriofagi stały się obiektem licznych badań, a także znalazły zastosowanie w leczeniu różnych chorób wywołanych przez patogeny człowieka. Warto podkreślić, że fagi wykazują również zdolność do penetracji biofilmu oraz degradacji jego macierzy [16], w związku z czym stanowią obiecujące narzędzie w bio-kontroli bakterii chorobotwórczych przenoszonych przez żywność, w tym bakterii *E. coli* O157:H7. Obecnie, wiele laboratoriów na całym świecie dąży do opracowania strategii opartych na zastosowaniu bakteriofagów w dekontaminacji różnego rodzaju powierzchni oraz żywności. W wyniku tych prac, w ostatnich latach na rynku spożywczym pojawiło się kilka preparatów fagowych przeciwko patogenom żywnościowym (m.in. *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* ssp., *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* i *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), które zostały uznane za bezpieczne i dopuszczone do stosowania na terenie USA, Chin oraz Europy. Co ważne, komercyjne preparaty fagowe (np. EcoShield PX™, Ecolicide™, PhageGuard E™ i Finalyse®) skuteczne w walce z bakteriami *E. coli* O157:H7 zostały również opracowane i cieszą się wielkim zainteresowaniem w przemyśle spożywczym [17].

W świetle powyższych doniesień, niepodważalny jest fakt, iż istnieje pilna konieczność opracowania niekonwencjonalnych strategii zapobiegania oraz zwalczania infekcji STEC. W związku z tym, celem badań wykonywanych w ramach mojej pracy doktorskiej było scharakteryzowanie nowo odkrytego i specyficznego wobec bakterii STEC bakteriofaga o nazwie vB\_Eco4M-7, jako potencjalnego narzędzia w terapii zakażeń bakteryjnych oraz bio-kontroli żywności.

Bakteriofag vB\_Eco4M-7 został wyizolowany ze ścieków miejskich pochodzących z Gdańskiej Oczyszczalni Ścieków. Procedury jego izolacji oraz namnażania w bakteriach gospodarza *E. coli* O157:H7 (ST2-8624) zostały opisane we wcześniejszych pracach zespołu, do którego dołączyłam na początku studiów doktoranckich [18].

W pierwszym etapie swoich badań, postanowiłam scharakteryzować genom faga vB\_Eco4M-7, wykorzystując narzędzia bioinformatyczne [**artykuł nr 1**]. Na podstawie wyników analiz bioinformatycznych stwierdziłam, że materiał genetyczny badanego wirusa to dwuniciowa cząsteczka DNA. Genom faga vB\_Eco4M-7 zawiera 96 otwartych ramek odczytu (ang. open reading frame, ORF), spośród których 35 ORF przypisano domniemane funkcje, biorąc pod uwagę stopień homologii sekwencji aminokwasowej ich potencjalnych produktów względem sekwencji innych białek o poznanej funkcji, które zdeponowane zostały w powszechnie dostępnych bazach danych. Co ciekawe, większość zidentyfikowanych ORF przynależy do czterech głównych bloków genów związanych z morfogenezą, pakowaniem DNA do kapsydu, replikacją DNA oraz lizą komórki gospodarza. Warto podkreślić, że genom faga vB\_Eco4M-7 nie zawiera sekwencji genów kodujących integrazy, rekombinazy, represory i ekscizionazy, dlatego też vB\_Eco4M-7 można uznać za wirusa litycznego. Ponadto, w genomie faga vB\_Eco4M-7 nie stwierdzono obecności genów kodujących czynniki antybakteryjne oraz genów determinujących wirulencję. Cechy te wskazują, iż bakteriofag vB\_Eco4M-7 nie powinien mieć wpływu na komórki eukariotyczne, co może świadczyć o jego potencjale aplikacyjnym w terapii STEC lub bio-kontroli żywności [**artykuł nr 1**].

Na podstawie zdjęć spod transmisyjnego mikroskopu elektronowego oraz wyników analizy pokrewieństw filogenetycznych bakteriofaga vB\_Eco4M-7 z innymi fagami, zaklasyfikowałam nowo odkrytego wirusa do rodziny *Myoviridae* [**artykuł nr 1**]. Ponadto, sekwencja nukleotydowa genomu faga vB\_Eco4M-7 wykazała wysoki stopień podobieństwa (94%) i identyczności (92%) z genomem faga vB\_ECML-117, który wchodzi w skład preparatu fagowego EcoShield PX™, stosowanego przeciwko bakteriom *E. coli* O157:H7 [19]. Co ciekawe, oba fagi wykazują różnicę w sekwencji genu vB\_Eco4M-7\_27 kodującego białko włókna ogonka, które odpowiada prawdopodobnie za rozpoznanie komórki gospodarza. Biorąc pod uwagę, iż ta różnica może świadczyć o odmiennej specyfice obu fagów w stosunku do gospodarza, w kolejnym etapie moich badań postanowiłam scharakteryzować oraz porównać morfologiczne i biologiczne właściwości tych blisko spokrewnionych wirusów [**artykuł nr 1**]. W pierwszej kolejności, stosując test kropelkowy, określiłam zdolność fagów vB\_Eco4M-7 oraz vB\_ECML-117 do infekcji różnych szczepów bakteryjnych. Zaobserwowałam, że oba bakteriofagi były zdolne do tworzenia łysek na murawach 16 izolatów *E. coli* O157:H7 produkujących toksynę

Shiga, 3 izolatów *E. coli* O157:H7 nie-STEC, 11 izolatów *E. coli* O157 STEC oraz 4 izolatów *E. coli* O157 nie-STEC. Bakteriofag vB\_Eco4M-7 nie był w stanie infekować żadnego izolatu *E. coli* O26 STEC, a także 41 innych izolatów nie-O157, w tym również niepatogennych bakterii *E. coli*. Co interesujące, bakteriofag vB\_ECML-117, w przeciwieństwie do faga vB\_Eco4M-7, wykazywał aktywność lityczną wobec 6 szczepów *E. coli* O25. Ponadto, wszystkie laboratoryjne szczepy *E. coli* oraz bakterie należące do innych gatunków były niewrażliwe na infekcję badanymi fagami. Następnie, określiłam również morfologię łysek obu wirusów bakteryjnych. Zaobserwowałam, że badane bakteriofagi tworzą na murawie szczepu *E. coli* O157:H7 (ST2-8624) małe, przejrzyste oraz jednorodne łyseki, które są charakterystyczne dla grupy fagów litycznych. Co istotne, wiriony fagów vB\_Eco4M-7 oraz vB\_ECML-117 okazały się również odporne na działanie niektórych laboratoryjnych środków dezynfekujących, takich jak mydło, płyn do mycia naczyń, Line-Antibacterial 70, czy też Virusolve. W **artykule nr 1** zaprezentowałam także kinetykę rozwoju litycznego badanych fagów. Wyniki otrzymane z eksperymentu typu „one-step growth” wskazują, iż oba wirusy charakteryzują się szybkim (trwa około 10 minut) i wydajnym (plon fagowy wynosił około 100 cząstek fagowych na komórkę) wewnątrzkomórkowym cyklem rozwojowym, któremu towarzyszy krótki okres eklipsy i latencji. Co ciekawe, porównując właściwości lityczne obu fagów w płynnej hodowli bakteryjnej zaobserwowałam, że bakteriofag vB\_Eco4M-7 spowodował efektywniejszy spadek liczby komórek gospodarza w porównaniu do faga vB\_ECML-117. Należy również podkreślić, że żaden z analizowanych wirusów nie przyczynił się do indukcji profaga ST2-8624 (przedstawiciel fagów Stx), który występuje w formie profaga, w genomie bakterii *E. coli* O157:H7 (ST2-8624).

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, mogę wysunąć wniosek, iż bakteriofag vB\_Eco4M-7, ze względu na swoje właściwości biologiczne, jest obiecującym kandydatem do dalszych badań nad jego zastosowaniem w terapii fagowej i/lub ochronie żywności przeciwko bakteriom *E. coli* produkującym toksyny Shiga. Co więcej, bakteriofag vB\_Eco4M-7 w połączeniu z fagiem vB\_ECML-117 lub innymi nowo wyizolowanymi wirusami bakteryjnymi może zostać wykorzystany do opracowania preparatu przeciwko patogenom przenoszonym drogą pokarmową. Pragnę nadmienić, iż pierwsze kroki w tym kierunku zostały już poczynione, bowiem badania prowadzone w niniejszej tematyce zaowocowały patentem o zasięgu krajowym przyznany przez Polski Urząd Patentowy (patent nr 240170).

Jak wspomniałam powyżej, szczepy *E. coli* O157:H7 wykazują zdolność przylegania do różnych powierzchni, kolonizowania ich oraz formowania na nich biofilmu, dzięki czemu z łatwością opanowują różnorodne środowiska związane z żywnością. Warto podkreślić, iż bakterie wchodzące w skład biofilmu charakteryzują się często większą odpornością na działanie czynników zewnętrznych, niż komórki planktonowe [20]. Zjawisko to związane jest ze skomplikowaną strukturą biofilmu, w którym bakterie otoczone są pozakomórkowymi substancjami polimerowymi (m.in. białkami, tłuszczami, polisacharydami i kwasami nukleinowymi) [14]. Obecnie, w celu eliminacji skażeń żywności bakteriami *E. coli* O157:H7 wykorzystuje się różnego typu rozwiązania, od tych najprostszych

opartych na myciu wodą, po chemiczne i fizyczne metody dekontaminacji żywności [21,22]. Należy podkreślić, iż niektóre podejścia mają swoje wady, a mianowicie pociągają za sobą wysokie koszty, prowadzą do uszkodzenia sprzętu, są szkodliwe dla środowiska i mogą zmieniać właściwości organoleptyczne żywności [23].

Mając na uwadze powyższe informacje, podczas realizacji pracy doktorskiej, postanowiłam odpowiedzieć na pytanie, czy bakteriofag vB\_Eco4M-7 może posłużyć jako środek w bio-kontroli żywności. W związku z tym, opracowałam system walidacji do selekcji bakteriofagów przeciwko skażeniu produktów żywnościowych bakteriami STEC, w którym jako modele badawcze wykorzystałam: bakteriofaga vB\_Eco4M-7, szczep *E. coli* O157:H7 (ST2-8624) oraz ogórki [artykuł nr 2]. Zdając sobie sprawę, iż skórka ogórka stanowi naturalną barierę ochronną, a także jest powierzchnią trudną do kolonizacji przez bakterie, zdecydowałam się przeprowadzić eksperyment z użyciem plasterów ogórka. Zaobserwowałam, że fag vB\_Eco4M-7 znacząco obniżył przeżywalność i liczbę komórek bakteryjnych na powierzchni plasterów ogórka po 6 godzinach inkubacji, przy każdej z zastosowanych wartości wielokrotności zakażenia (ang. multiplicity of infection, MOI), z zakresu od 0,0001 do 10. Natomiast, wydłużenie czasu inkubacji do 24 godzin spowodowało ponowny wzrost liczby patogennych bakterii, jednakże nadal widoczna była istotna różnica w przeżywalności komórek gospodarza między kontrolą a próbkami potraktowanymi lizatem faga vB\_Eco4M-7. Co ciekawe, podczas 24-godzinnej inkubacji bakteriofag vB\_Eco4M-7 wykazywał najwyższą aktywność lityczną wobec bakterii STEC przy niższych wartościach MOI (0,0001-0,01). W związku z tym, że wzrost bakterii STEC w dużej mierze zależał od liczby cząstek fagowych zaaplikowanych na powierzchni ogórka, w kolejnym etapie pracy postanowiłam sprawdzić, czy podobne zjawisko może zachodzić w płynnej hodowli bakteryjnej. Znaczący spadek wartości gęstości optycznej hodowli bakteryjnej odnotowałam po upływie niecałych 4 godzin od momentu dodania lizatu faga vB\_Eco4M-7 do MOI równego 0,1; 1 oraz 10, co może świadczyć o efektywnej lizie wrażliwych na wirusa komórek gospodarza. Natomiast, przy niższych wartościach MOI (0,001 – 0,1), spadek gęstości optycznej hodowli *E. coli* O157:H7 (ST2-8624) był znacznie wolniejszy i nie tak efektywny, jak przy zastosowaniu wyższych wartości współczynnika zakażenia. Ponadto, po 24 h inkubacji hodowli bakteryjnej z fagiem vB\_Eco4M-7 zaobserwowałam pojawianie się mutantów opornych na tego bakteriofaga, przy wszystkich analizowanych wartościach MOI. Co istotne, wydajność procesu tworzenia mutantów niewrażliwych na infekcję fagiem vB\_Eco4M-7 była bardziej efektywna przy zastosowaniu wysokich wartości MOI, niż w przypadku tych niższych, jak 0,001 czy 0,0001. Wydaje się, iż zjawisko to może być związane z silną presją selekcyjną warunkowaną przez wysokie wartości MOI. W takich warunkach najprawdopodobniej każda z komórek gospodarza zostaje zainfekowana przez wirusa bakteryjnego, w związku z czym tylko mutanty odporne mają szansę przetrwać i namnażać się w obecności bakteriofaga. Z drugiej strony, w przypadku zastosowania niższych wartości MOI, presja selekcyjna jest słabsza (mniejsza liczba cząstek fagowych przypada na jedną komórkę bakteryjną), dzięki czemu komórki dzikiego typu mogą wygrać walkę o przetrwanie z mutantami

opornymi, które charakteryzują się upośledzeniem niektórych funkcji życiowych. Warto jednak podkreślić, iż uzyskane wyniki badań nie dyskwalifikują zastosowania faga vB\_Eco4M-7 jako środka antybakteryjnego w bio-kontroli żywności, bowiem pojawienie się tak silnej presji selekcyjnej mutantów opornych w środowisku naturalnym wydaje się wielce nieprawdopodobne. Przypuszczenie to wymaga jednak potwierdzenia w postaci kolejnych badań, które należałoby przeprowadzić w warunkach panujących w naturalnym środowisku związanym z żywnością. Biorąc pod uwagę fakt, iż preparat antybakteryjny powinien być bezpieczny dla zdrowia człowieka, w kolejnym etapie moich badań postanowiłam sprawdzić toksyczność faga vB\_Eco4M-7 wobec wybranej linii komórek ssaczych Balb/3T3 [artykuł nr 2]. Co istotne, nie stwierdziłam spadku żywotności badanych komórek po 24 godzinach inkubacji z lizatem vB\_Eco4M-7. Ponadto, komórki Balb/3T3 traktowane fagiem vB\_Eco4M-7 nie wykazały zmian w morfologii, w porównaniu do wariantu kontrolnego. Otrzymane wyniki potwierdziły moje przypuszczenia o nietoksyczności faga vB\_Eco4M-7 wobec komórek ssaczych, a także utwierdziły mnie w przekonaniu o jego użyteczności w procedurach związanych z ochroną żywności [artykuł nr 2]. Warte uwagi są również wyniki wskazujące na zdolność bakteriofaga vB\_Eco4M-7 do namnażania się i lizy komórek *E. coli* O157:H7 w niższych temperaturach (12°C i 25°C), które są charakterystyczne dla miejsc przechowywania żywności [artykuł nr 2]. Wyniki zawarte w artykule nr 2 potwierdzają aplikacyjny charakter faga vB\_Eco4M-7 w ochronie produktów spożywczych przed skażeniem bakteriami *E. coli* O157:H7, jednakże przy opracowywaniu preparatów należy mieć na uwadze presję selekcyjną mutantów opornych na tego bakteriofaga.

Pragnę również nadmienić, iż **artykuł nr 2** został zaliczony przez redakcję czasopisma „*Toxins*” do grupy prac, których wyniki wywarły znaczący wpływ na rozwój tematyki związanej z toksynami. Wybrane artykuły są dostępne na stronie: [www.mdpi.com/journal/toxins/editors\\_choice](http://www.mdpi.com/journal/toxins/editors_choice).

Liczne wyniki badań wskazują na kliniczny potencjał stosowania fagów litycznych w kombinacji z antybiotykami przeciwko biofilmom bakteryjnym tworzonym przez szczepy STEC [24]. Głównym problemem tego typu strategii jest jednak wybór właściwego czynnika antybakteryjnego, który nie powodowałby indukcji profagów Stx [25]. W związku z tym, postanowiłam sprawdzić działanie faga vB\_Eco4M-7 w pojedynkę albo w koktajlu z fagiem vB\_ECML-117 oraz w terapii skojarzonej z różnymi antybiotykami, na biofilm utworzony przez szczep *E. coli* O157:H7 (ST2-8624) [artykuł nr 3]. W eksperymentach zastosowałam dwa antybiotyki o odmiennym mechanizmie działania, ciprofloksacynę i rifampicynę [26, 27], w tzw. stężeniach nadprogowych (ang. supra-minimal inhibitory concentration, supra-MIC). Biofilm inkubowałam z czynnikami antybakteryjnymi przez 6 h, aplikując je pojedynczo, sekwencyjnie bądź jednocześnie. W celu określenia właściwości antybiofilmowych bakteriofaga vB\_Eco4M-7 oraz koktajlu fagowego zastosowałam standardowe metody pozwalające na ocenę degradacji biofilmu, jak np. pomiar OD<sub>600</sub>, szacowanie liczby żywych komórek, kwantyfikacja biomasy biofilmu w oparciu o pomiary densytometryczne oraz barwienie fioletem krystalicznym. W pierwszym etapie moich badań wykazałam, iż potraktowanie biofilmu lizatem fagowym vB\_Eco4M-7, przy MOI równym 100, doprowadziło do spadku wartości gęstości

optycznej hodowli bakteryjnej oraz obniżenia liczby żywych komórek, w porównaniu do wariantu kontrolnego. Co ciekawe, zastosowanie koktajlu fagowego przeciw biofilmowi bakteryjnemu dało bardziej spektakularny efekt, jednakże frakcja komórek, które przetrwały infekcję wirusem była nadal znacząca. W związku z tym, w kolejnym etapie moich badań poddałam analizie skuteczność działania mieszaniny złożonej z bakteriofagów oraz antybiotyków na eradykację biofilmu bakteryjnego. Zaobserwowałam, iż jednoczesne zastosowania faga vB\_Eco4M-7 albo koktajlu fagowego z badanymi antybiotykami znacząco obniżyło wartości gęstości optycznej hodowli bakteryjnej, liczbę żywych komórek oraz grubość warstwy biofilmu. Jednakże, najbardziej efektywną strategią w degradacji biofilmu okazało się podejście sekwencyjne, kiedy to infekcja komórek bakteryjnych fagiem poprzedzała aplikację antybiotyku. Mogę wnioskować, iż synergistyczny efekt działania fagów i antybiotyków najprawdopodobniej związany jest z rozluźnieniem struktury biofilmu przez badane fagi, dzięki czemu cząsteczki antybiotyków są w stanie dotrzeć do głębszych warstw biofilmu, co w efekcie zwiększa skuteczność ich działania. Ponadto, sekwencyjne traktowanie biofilmu badanymi czynnikami generowało najmniejszą liczbę mutantów opornych na faga vB\_Eco4M-7 oraz antybiotyki. W ostatnim etapie pracy sprawdziłam, czy testowane czynniki antybakteryjne (indywidualnie albo w kombinacji) mogą powodować indukcję profaga ST2-8624 w płynnej hodowli bakterii *E. coli* O157:H7 (ST2-8624). Jako kontrolę pozytywną zastosowałam mitomycynę C, która uważana jest za silny induktor łagodnych profagów [28]. Zaobserwowałam, iż ciprofloksacyna była prawie tak samo skuteczna w indukcji profaga ST2-8624 jak mitomycyna C, podczas gdy w hodowli wzrastającej w obecności rifampicyny cząstki faga ST2-8624 nie zostały wykryte. Co ciekawe, potraktowanie bakterii STEC fagiem vB\_Eco4M-7 lub koktajlem fagowym, indywidualnie albo w połączeniu z rifampicyną, całkowicie zahamowało proces indukcji spontanicznej profaga ST2-8624. Mając na uwadze wyniki zaprezentowane w **artykule nr 3** mogę wnioskować, że bakteriofag vB\_Eco4M-7 w pojedynkę, jak i w koktajlu fagowym jest zdolny do degradacji biofilmu formowanego przez szczepy STEC. Ponadto, należy podkreślić, iż rifampicyna lub podobnie działające do niej związki, w połączeniu z bakteriofagiem vB\_Eco4M-7, mogą zostać uznane za bezpiecznych i skutecznych kandydatów na środki lecznicze skierowane przeciwko infekcjom STEC.

Wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej dowodzą, iż nowo wyizolowany bakteriofag vB\_Eco4M-7 prezentuje wiele cech, które czynią go potencjalnym kandydatem do wykorzystania w terapii fagowej lub bio-kontroli żywności przeciwko bakteriom *E. coli* produkującym toksyny Shiga. Cechy morfologiczne faga vB\_Eco4M-7, jego specyficzność względem komórek gospodarza, stabilność cząstek fagowych, brak toksyczności wobec komórek eukariotycznych, a także skuteczność jego działania przeciwko bakteriom *E. coli* O157:H7, zostały potwierdzone przeze mnie eksperymentalnie. Warto podkreślić, iż tego typu badania mogą pozwolić na lepsze zrozumienie nie tylko biologii bakteriofagów, ale również takich specjalności naukowych jak genetyka, immunologia czy farmakologia. Wskazują one, że wirusy bakteryjne można uznać za jedno z najbardziej obiecujących narzędzi w zwalczaniu infekcji bakteryjnych. Jednakże, stosowanie bakteriofagów w medycynie



oraz przemysle spozywczym stwarza wiele wyzwań i problemow, ktore nalezy rozwiac, by uniknac ograniczen jakie niesie za soba tego typu strategia antybakteryjna.

## Referencje:

1. Katouli M. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iran J Microbiol.* **2010**, *2(2)*, 59-72.
2. Frazão N, Sousa A, Lässig M, Gordo I. Horizontal gene transfer overrides mutation in *Escherichia coli* colonizing the mammalian gut. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2019**, *116(36)*, 17906-17915; doi:10.1073/pnas.1906958116.
3. Bloch SK, Felczykowska A, Nejman-Faleńczyk B. *Escherichia coli* O104:H4 outbreak--have we learnt a lesson from it?. *Acta Biochim Pol.* **2012**, *59(4)*, 483-488.
4. Chan YS, Ng TB. Shiga toxins: from structure and mechanism to applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2016**, *100(4)*, 1597-1610; doi:10.1007/s00253-015-7236-3.
5. Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci.* **2007**, *85(13 Suppl)*, E45-E62; doi:10.2527/jas.2006-508.
6. Spickler A. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and other *E. coli* causing hemolytic uremic syndrome. **2016**; cfsph.iastate.edu/diseaseinfo/factsheets/.
7. Rahal EA, Kazzi N, Nassar FJ, Matar GM. *Escherichia coli* O157:H7-clinical aspects and novel treatment approaches. *Front Cell Infect Microbiol.* **2012**, *2*, 138; doi:10.3389/fcimb.2012.00138.
8. Bryan A, Youngster I, McAdam AJ. Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Clin Lab Med* **2015**, *35(2)*, 247-272; doi:10.1016/j.cll.2015.02.004.
9. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med.* **1983**, *308(12)*, 681-685; doi:10.1056/NEJM198303243081203.
10. Carter CD, Parks A, Abuladze T, et al. Bacteriophage cocktail significantly reduces *Escherichia coli* O157:H7 contamination of lettuce and beef, but does not protect against recontamination. *Bacteriophage* **2012**, *2(3)*, 178-185; doi:10.4161/bact.22825.
11. Lim JY, Yoon J, Hovde CJ. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol.* **2010**, *20(1)*, 5-14.
12. Ryu JH, Beuchat LR. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol.* **2005**, *71(1)*, 247-254; doi:10.1128/AEM.71.1.247-254.2005.
13. Wang R, Luedtke BE, Bosilevac JM, Schmidt JW, Kalchayanand N, Arthur TM. *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from high-event period beef contamination have strong biofilm-forming ability and low sanitizer susceptibility, which are associated with high pO157 plasmid copy number. *J Food Prot.* **2016**, *79(11)*, 1875-1883; doi:10.4315/0362-028X.JFP-16-113.
14. Topka-Bielecka G, Dydecka A, Necel A, et al. Bacteriophage-derived depolymerases against Bacterial Biofilm. *Antibiotics (Basel)* **2021**, *10(2)*, 175; doi:10.3390/antibiotics10020175.
15. McCallin S, Alam Sarker S, Barretto C, et al. Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects. *Virology* **2013**, *443(2)*, 187-196; doi:10.1016/j.virol.2013.05.022.
16. Topka-Bielecka G, Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, et al. Characterization of the Bacteriophage vB\_EfaS-271 Infecting *Enterococcus faecalis*. *Int J Mol Sci.* **2020**, *21(17)*, 6345; doi:10.3390/ijms21176345.
17. Moye ZD, Woolston J, Sulakvelidze A. Bacteriophage Applications for food production and Processing. *Viruses* **2018**, *10(4)*, 205; doi:10.3390/v10040205.
18. Jurczak-Kurek A, Gąsior T, Nejman-Faleńczyk B, et al. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Sci Rep.* **2016**, *6*, 34338; doi:10.1038/srep34338.

19. Dissanayake U, Ukhanova M, Moye ZD, Sulakvelidze A, Mai V. Bacteriophages reduce pathogenic *Escherichia coli* counts in mice without distorting gut microbiota. *Front Microbiol.* **2019**, *10*, 1984; doi:10.3389/fmicb.2019.01984.
20. Angel Villegas N, Baronetti J, Albesa I, *et al.* Effect of antibiotics on cellular stress generated in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 biofilms. *Toxicol In Vitro* **2015**, *29(7)*, 1692-1700; doi:10.1016/j.tiv.2015.06.025.
21. Lim ES, Koo OK, Kim MJ, Kim JS. Bio-enzymes for inhibition and elimination of *Escherichia coli* O157:H7 biofilm and their synergistic effect with sodium hypochlorite. *Sci Rep.* **2019**, *9(1)*, 9920; doi:10.1038/s41598-019-46363-w.
22. Hu WS, Min Nam D, Kim JS, Koo OK. Synergistic anti-biofilm effects of Brassicaceae plant extracts in combination with proteinase K against *Escherichia coli* O157:H7. *Sci Rep.* **2020**, *10(1)*, 21090; doi:10.1038/s41598-020-77868-4.
23. Sabouri S, Sepehrizadeh Z, Amirpour-Rostami S, Skurnik M. A minireview on the in vitro and in vivo experiments with anti-*Escherichia coli* O157:H7 phages as potential biocontrol and phage therapy agents. *Int J Food Microbiol.* **2017**, *243*, 52-57; doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.004.
24. Easwaran M, De Zoysa M, Shin HJ. Application of phage therapy: Synergistic effect of phage EcSw ( $\Phi$ EcSw) and antibiotic combination towards antibiotic-resistant *Escherichia coli*. *Transbound Emerg Dis.* **2020**, *67(6)*, 2809-2817; doi:10.1111/tbed.13646.
25. Kakoullis L, Papachristodoulou E, Chra P, Panos G. Shiga toxin-induced haemolytic uraemic syndrome and the role of antibiotics: a global overview. *J Infect.* **2019**, *79(2)*, 75-94; doi:10.1016/j.jinf.2019.05.018.
26. Ojkic N, Lilja E, Direito S, Dawson A, Allen RJ, Waclaw B. A roadblock-and-kill mechanism of action model for the DNA-targeting antibiotic ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* **2020**, *64(9)*, e02487-19; doi:10.1128/AAC.02487-19.
27. Mosaei H, Zenkin N. Inhibition of RNA polymerase by rifampicin and rifamycin-like molecules. *EcoSal Plus* **2020**, *9(1)*, 10.1128/ecosalplus.ESP-0017-2019; doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0017-2019.
28. Shinagawa H, Mizuuchi K, Emmerson PT. Induction of prophage lambda by gamma-rays, mitomycin C and tif; repressor cleavage studied by immunoprecipitation. *Mol Gen Genet.* **1977**, *155(1)*, 87-91; doi:10.1007/BF00268564.

#### Artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

**Artykuł nr 1:** Necel A, Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, *et al.* Characterization of a bacteriophage, vB\_Eco4M-7, that effectively infects many *Escherichia coli* O157 strains. *Sci Rep.* **2020**, *10(1)*, 3743; doi:10.1038/s41598-020-60568-4.

**Artykuł nr 2:** Necel A, Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, *et al.* A validation system for selection of bacteriophages against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* contamination. *Toxins (Basel)* **2021**, *13(9)*, 644; doi:10.3390/toxins13090644.

**Artykuł nr 3:** Necel A, Bloch S, Topka-Bielecka G, *et al.* Synergistic effects of bacteriophage vB\_Eco4-M7 and selected antibiotics on the biofilm formed by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Antibiotics* **2022**, *11*, 712; doi:10.3390/antibiotics11060712.