

15.07.2024

UNIVENTUM LABS SP. Z O.O.

ul. Jana Bażyńskiego 4,  
pokój S341, 80-309 Gdańsk

## **RAPORT KOŃCOWY Z WYKONANYCH PRAC - PROJEKT DRÓB 2**

pt. „*Badania naukowe mające na celu poprawę jakości mięsa drobiowego w Polsce – badania nad bakteriofagami zwalczającymi Salmonellę*”

**październik-lipiec**

**16.10.23.-15.07.24**

wykonawcy: dr Gracja Topka-Bielecka, dr Aleksandra Dydecka, dr Jagoda Mantej

**Projekt realizowany był w trzech etapach:**

**Etap I: 16.10.23-05.01.24,**

**Etap II: 06.01.24-15.04.24,**

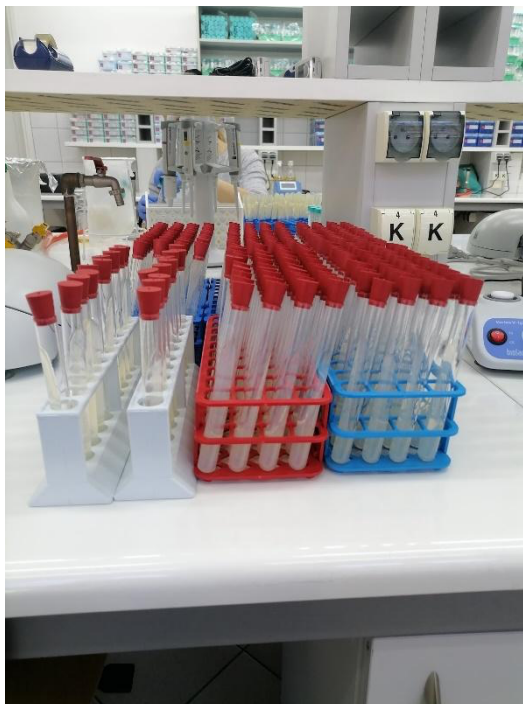
**Etap III: 16.04.24-15.07.24.**

Celem projektu było wyizolowanie ze środowiska i wstępne scharakteryzowanie bakteriofagów, które aktywnie degradują serowary *Salmonella* zgromadzone w kolekcji utworzonej w Pierwszym Projekcie Badawczym. Końcowym efektem projektu było uzyskanie kolekcji bakteriofagów, z których w przyszłości możliwe będzie skomponowanie preparatów fagowych. Powstałe w ten sposób preparaty biologiczne mogą przyczynić się do ograniczenia występowania bakterii *Salmonella* w produkcji drobiarskiej- w całym łańcuchu produkcyjnym a w tym w wylęgarniach, hodowli drobiu, chowie drobiu, ubojniach oraz zakładach przetwórstwa, czyli w całym łańcuchu produkcyjnym „od pola do stołu”.

### **ETAP I**

Przed rozpoczęciem zaplanowanych prac w tym etapie dodatkowo wykonano posiewy mikrobiologiczne na płytki z podłożem LA w celu utrzymania banku szczepów *Salmonella* pochodzących z różnych instytucji zewnętrznych. Ponadto zabezpieczono szczepy bakteryjne poprzez wykonanie:

1. Skosów agarowych na podłożu do przechowywania szczepów wzorcowych (Agar odżywczy wg. ISO 21528) w probówkach szklanych o pojemności ok. 15 ml z korkiem gumowym, przechowywane w temperaturze pokojowej.



*Ryc. 1 Skosy agarowe.*

2. Konserw w glicerolu w probówkach laboratoryjnych typu eppendorf (1,5 ml) przechowywanych w  $-80^{\circ}\text{C}$ .



*Ryc. 2 Konserwy w glicerolu.*

Kolekcja została posiana na podłożach oraz materiałach zapewniających odpowiednie warunki do przechowywania szczepów wzorcowych bakterii *Salmonella*. Próby przechowywane są w odpowiedniej temperaturze i oznaczonym pudełku. Każda próbka posiada odpowiednią etykietę informacyjną (numer wewnętrzny, nazwa instytucji, serowar, data wykonania próby oraz nazwa podłoża lub sposobu przechowywania). Informację o ilości kopii biologicznych oraz sposobie przechowywania znajdują się w katalogu. Wszystkie szczepy zostały skatalogowane w pliku arkusza kalkulacyjnego excel o nazwie BAZA SEROWARÓW SALMONELLA. Katalog zawiera spis szczepów według instytucji, z której zostały pozyskane i nazwy serowaru. Nadano im również numer wewnętrzny. Plik zawiera również informacje przekazane przez odpowiednie instytucje dotyczące charakterystyki odpowiednich serowarów. Kopie zostały umieszczone na dyskach HDD oraz SDD opatrzonych indywidualnym hasłem.

Bank kolekcji szczepów *Salmonella* został wykonany zgodnie zachowaniem wszelkich środków bezpieczeństwa.

### **Celem prac w okresie obejmującym miesiące październik-grudzień 2023 było:**

1. Pobór materiału badawczego, który posłuży do izolacji bakteriofagów z różnych źródeł m. in: ścieków komunalnych, odchodów ptaków, obiektów przemysłowego chowu drobiu, wody ze stawów i gleby z miejsc gdzie przebywa ptactwo hodowlane i wolnożyjące,
2. Przygotowanie i zabezpieczenie materiału badawczego do analiz.

### **1. Pobór materiału badawczego, który posłużył do izolacji bakteriofagów z różnych źródeł m. in:**

1. Próbkę ścieków komunalnych otrzymanych z oczyszczalni - wszystkich rodzajów (dobowe i chwilowe).

Próbki ścieków komunalnych pobrane z oczyszczalni należących do największych w Polsce a dysponujących dużymi zlewniami ścieków, czyli takich, których RLM (równoważna liczba mieszkańców) wynosi ponad 10 000. Ścieki ze zbiórki chwilowej i dobowej pobierane były łącznie 11 razy, każdorazowo w ilości co najmniej 5 litrów z Oczyszczalni Ścieków Gdańsk Wschód w Sobieszewie oraz z Grupowej Oczyszczalni Ścieków „Dębogórze”. Uzyskane próbki łącznie obejmowały ścieki z terenu Gdyni, Rumii, Redy, Wejherowa, Gdańska oraz z gmin sąsiednich: Kolbudy, Żukowo, Sopot, Pruszcz Gdański (Gmina i Miasto).

Aby móc zrealizować ten etap prac zostały podpisane odpowiednie dokumenty m. in:

1. Porozumienie współpracy przy realizacji Zadania pod nazwą: Charakterystyka wirusów bakteryjnych (bakteriofagów) w ściekach bytowo-gospodarczych kanalizacji sanitarnej w celach naukowo-badawczych zawarte w dniu 24.05.2023 pomiędzy: Univentum Labs Sp. z o.o. - Spółką celową Uniwersytetu Gdańskiego a Gdańskie Wodociągi S.A., z siedzibą w Gdańsku;
2. Zgoda na udostępnianie próbek ścieków wydana przez zastępcę kierownika Wydziału Oczyszczalni Ścieków „Dębogórze” ds. Technologii Ewę Dobiegałą w dniu 19.05.2023



*Ryc. 3 Oczyszczalnia ścieków Gdańsk Wschód w Sobieszewie, ul. Benzynowa 26, 80-711 Gdańsk*



*Ryc. 4 Siedziba laboratorium PEWIK Grupowej Oczyszczalni Ścieków „DĘBOGÓRZE”  
ul. Henryka Dąbrowskiego 58, 84-230 Rumia*

Próby ścieków komunalnych pobierane były w objętości 5 L do odpowiednio oznakowanych kanistrów.

Kanistry zostały wykonane z wysokiej jakości polietylenu zapewniające bezpieczne przechowywanie, spełniające rygorystyczne normy międzynarodowe i posiadające dopuszczenia wynikające z przepisów RID/ADR, IMDG Code, IATA.

Próbki dostarczone zostały do laboratorium jak najszybciej od momentu pobrania i przechowywane w warunkach chłodniczych (+4°C).



*Ryc. 5 Próbkę ścieków komunalnych.*

#### B) Próbkę odchodów drobiu pochodzące z kurników i ubojni

Odchody ptaków z co najmniej 20 obiektów przemysłowego chowu drobiu i ubojni (powyżej 20 000 osobników) zostały zebrane i dostarczone przez członka Krajowej Federacji Hodowców Drobiu i Producentów Jaj. Próbkę odchodów i ściółki drobiu zostały dostarczone w pojemnikach o pojemności 25-300 ml, odpowiednio zabezpieczone przed światłem słonecznym i przechowywane w warunkach chłodniczych (+4°C) natychmiast po otrzymaniu.

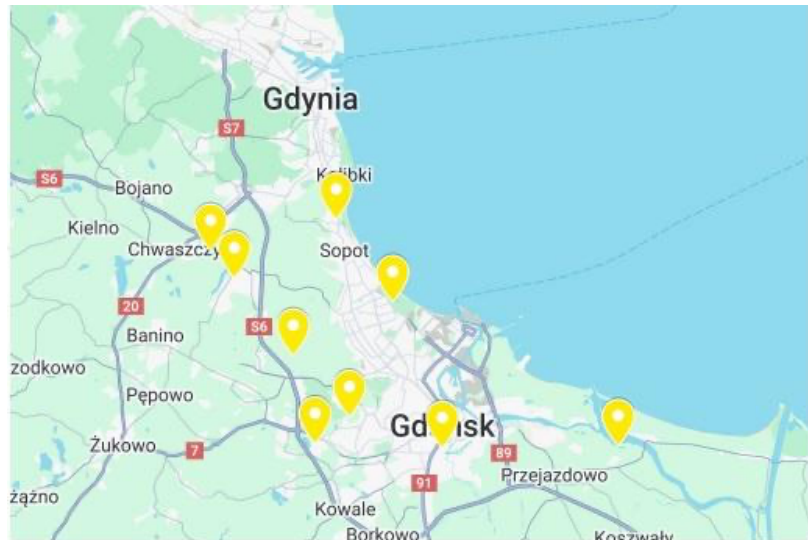


*Ryc. 6 Próbki odchodów drobiu.*

C) Próbki wody i gleby ze stawów, rzek i zbiorników wodnych oraz ich okolic, gdzie bytuje dzikie ptactwo zostały pobrane na terenie Gdańska i Sopotu:

1. Teren ogródków działkowych ROD Morenka, Gdańsk
2. Teren ogródków działkowych ROD Jasień, Gdańsk
3. Staw w Parku Chirona, Gdańsk
4. Potok Oliwski, Gdańsk
5. Stacja Wodna w Wiślince, Pruszcz Gdański
6. Jezioro Osowskie Gdańsk
7. Optyw Motławy, Gdańsk
8. Park Reagana, Gdańsk
9. Kamienny Potok, Sopot

- 📍 Jezioro Osowskie
- 📍 Kamienny Potok
- 📍 Park Chirona
- 📍 Rodzinny Ogród Działkowy Morenka
- 📍 Potok Oliwski
- 📍 Stanica Wodna w Wiślince
- 📍 Opływ Motławy
- 📍 Park Reagana
- 📍 Rodzinny Ogród Działkowy Jasień



Ryc. 7 Lokalizacja poboru prób na terenie Gdańska i Sopotu w/g map google.



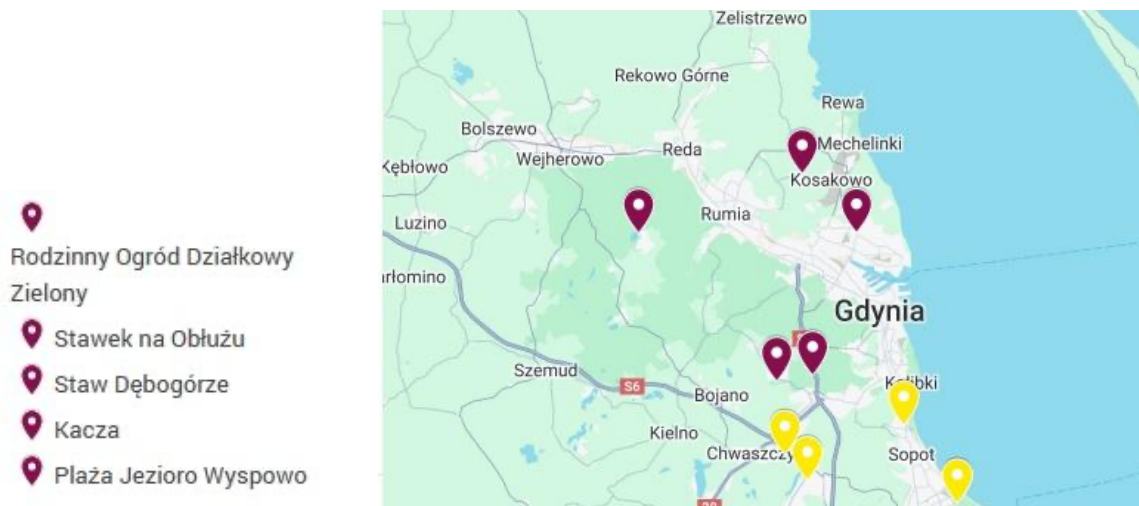


Ryc.8 Próby wody i gleby z Gdańska i Sopotu.

Lokalizacja poboru prób na terenie Gdyni oraz okolicznych gmin:

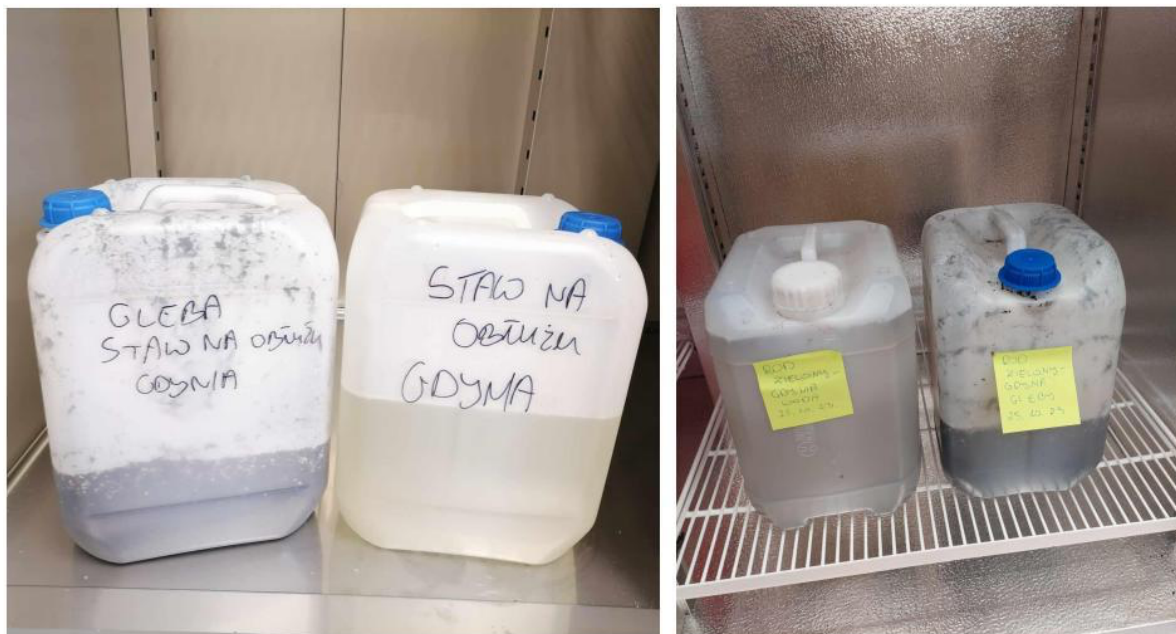
1. Gdynia Teren Rodzinnego Ogrodu Działkowego Zielonego, Gdynia
2. Stawek na Obłuzu, Gdynia
3. Staw Dębogórze, Kosakowo
4. Rzeka Kacza, Gdynia
5. Jezioro Wysypowo, Zbychowo

## Lokalizacja poboru prób na terenie Gdyni i okolic wg map google



Ryc 9. Lokalizacja poboru prób na terenie Gdyni i okolic w/g map google.





Ryc.10 Próby wody i gleby z Gdyni.

Lokalizacja poboru prób na terenie Kościerzyny:

6. Jezioro Osuszyno, Kościerzyna



Ryc. 11 Lokalizacja poboru prób wg map google oraz zdjęcie próbek wody i gleby z terenu Kościerzyny i okolic.

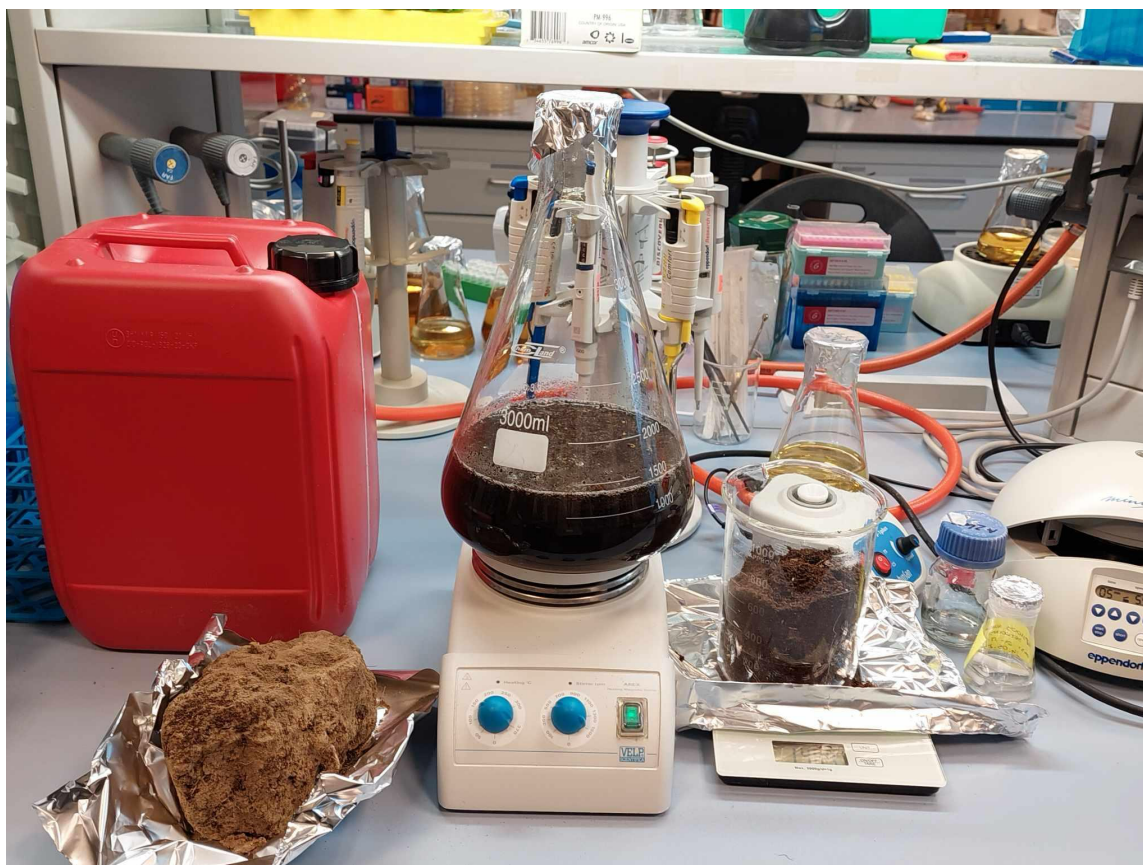
Próby wody pobierane były w objętości 5 L, natomiast próby gleby w ilości 2 kg do odpowiednio oznakowanych kanistrów.

Kanistry zostały wykonane z wysokiej jakości polietylenu zapewniające bezpieczne przechowywanie, spełniające rygorystyczne normy międzynarodowe i posiadające dopuszczenia wynikające z przepisów RID/ADR, IMDG Code, IATA.

Próby dostarczone zostały do laboratorium jak najszybciej od momentu pobrania i przechowywane w warunkach chłodniczych (+4°C).

## 2. Przygotowanie i zabezpieczenie materiału badawczego do analiz

1. Odchody ptaków oraz gleba zostały odpowiednio rozporcjowane, zawieszono w buforze TM i poddano homogenizacji w celu rozdrobnienia dużych cząstek materiału biologicznego. Zabezpieczone przed dostępem światła słonecznego były przechowywane w warunkach chłodniczych (+4°C).



*Ryc. 12 Odchody ptaków oraz gleba.*

2. Próby pobrane ze stawów, rzek, zbiorników wodnych oraz ścieków komunalnych zostały zagęszczone przez łagodne podgrzanie i odparowanie, a następnie zabezpieczone przed dostępem światła słonecznego i były przechowywane w warunkach chłodniczych (+4°C).

## **ETAP II**

**Celem prac w kwartale obejmującym miesiące styczeń-kwiecień 2024 było:**

1. Przygotowanie prób środowiskowych do procesu izolacji bakteriofagów.
  2. Wyizolowanie bakteriofagów infekujących szczepy bakterii *Salmonella* pochodzących z kolekcji stworzonej w Pierwszym Projekcie (106 szczepów).
  3. Rozdział wyizolowanych bakteriofagów do pojedynczych szczepów wykazujących łyśinki o jednorodnej morfologii.
  4. Namnażanie poszczególnych bakteriofagów na skalę preparatywną i uzyskanie lizatów.
  5. Oczyszczenie lizatów bakteriofagowych za pomocą ultrawierwienia w gradiencie chlorku cezu.
  6. Przygotowanie banku ultraczystych lizatów bakteriofagowych.
1. **Przygotowanie prób środowiskowych do procesu izolacji bakteriofagów.**

Bakteriofagi zostały wyizolowane z różnych źródeł m.in: ścieków komunalnych, wody ze stawu, odchodów ptaków czy próbek gleby. Metoda izolacji została wcześniej dopracowana dla poszczególnych prób środowiskowych. W pierwszej kolejności odpowiednio przygotowano próbki (odchody ptaków i glebę) czyli odważono odpowiednią ilość odchodów bądź gleby i stopniowo zmieszano z podłożem mikrobiologicznym, tak aby otrzymać zawiesinę potrzebną do kultywacji (hodowli) z odpowiednimi szczepami bakteryjnymi. W przypadku ścieków komunalnych czy wody ze stawu ten etap nie był konieczny. Pobrane próbki ścieków o objętości 2 litrów zagęszczono przez łagodne podgrzanie na mieszadle magnetycznym.

### **2. Właściwy proces izolacji bakteriofagów ze środowiska**

Aby rozpocząć **właściwy proces izolacji** w pierwszym etapie konieczne było przygotowanie nocnych hodowli bakteryjnych wybranych szczepów. W związku z tym, każdy

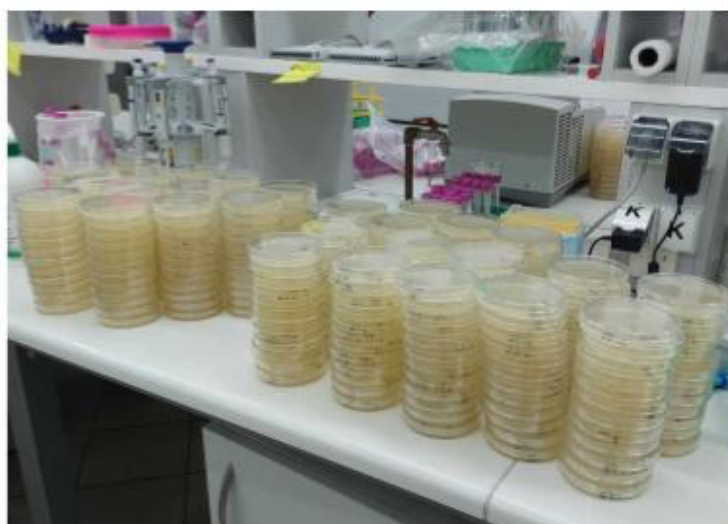
eksperyment poprzedzony był przygotowaniem 106 kolbek z pożywką LB, dodaniem do każdej kolbki odpowiedniego szczepu bakterii i hodowaniem przez noc w 37°C.



*Ryc. 13 Przygotowanie nocnych hodowli bakteryjnych dla pojedynczego procesu izolacji.*

Następnym etapem była hodowla polegająca na inkubacji danej próbki środowiskowej z odmłodzoną hodowlą określonego szczepu bakterii ( $OD^{600} \approx 0,2-0,3$ ) i wytrząsanie całości w 37 °C przez kilka godzin (3-5h). Po tym czasie próbki wirowano (2 000 x g, 4 °C) i wysiewano na stałe podłoża selekcyjne (LA) z zastosowaniem metody agaru dwuwarstwowego. W tym celu wykonano seryjne rozcieńczenia lizatów fagowych w buforze TM. 50 µl każdego rozcieńczenia wymieszano z 1 ml hodowli potencjalnego gospodarza, dodano 2 ml agaru górnego (Tag). Całość wylano na płytki z podłożem stałym (LA). Płytki inkubowano przez noc w temperaturze 37 °C.

**a)**

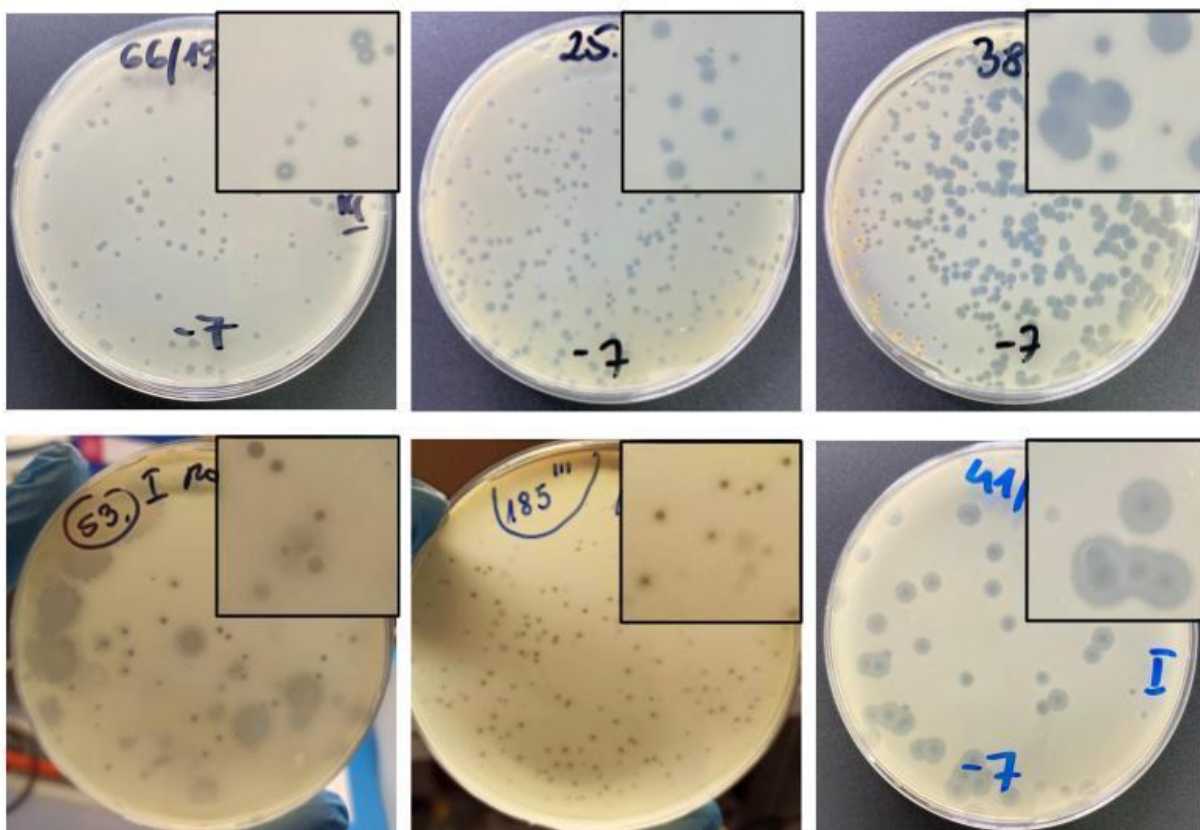


**b)**



*Ryc. 14 a) Posiew na podłoża selekcyjne, b) inkubacja płytek w celu hodowli bakterii i bakteriofagów w cieplarnie, w temperaturze 37 °C.*

Na płytkach z podłożem stałym wyrosła murawa bakteryjna, a na niej pojawiły się przejaśnienia (łysinki) o różnorodnej morfologii, świadczące o tym, że wyizolowano kilka różnych szczepów bakteriofagów namnażających się na danym szczepie bakterii.

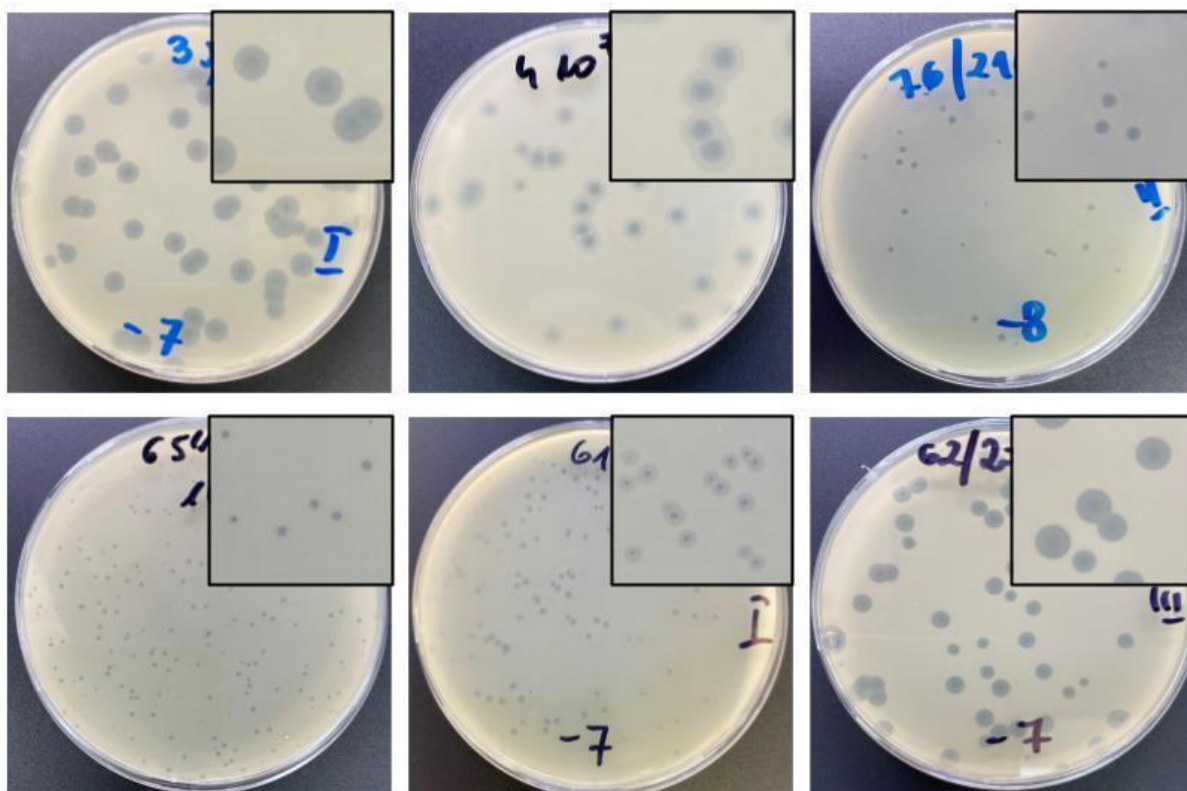


Ryc. 15 Przykładowe zdjęcia przedstawiające płytki z murawą bakteryjną i lysinkami fagowymi o różnej morfologii (kształcie, wielkości), co świadczy o tym, że wyizolowano więcej niż jeden szczep bakteriofaga zjadliwego wobec konkretnego szczepu bakteryjnego.

### 3. Rozdział wyizolowanych bakteriofagów do pojedynczych szczepów, wykazujących lysinki o jednorodnej morfologii.

Z otrzymanej murawy bakteryjnej wycinano powstałe lysinki fagowe za pomocą jałowej ezy. Pojedyncze lysinki dodawano do hodowli szczepu gospodarza bakteryjnego ( $OD^{600} \approx 0,1 - 0,2$ ) a następnie bakterie inkubowano w  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aż do zaobserwowania zmniejszenia się gęstości optycznej hodowli w stosunku do próby kontrolnej, którą stanowiła niczym nie traktowana hodowla gospodarza. Otrzymany lizat ponownie wysiewano na płytki z podłożem (LA). Procedurę powtarzano, aż do momentu otrzymania jednorodnych lysinek fagowych (co świadczyło o izolacji pojedynczych szczepów bakteriofagów). Procedura izolacji została przeprowadzona wielokrotnie, wykorzystując próbki pochodzące z wielu źródeł środowiskowych.

Procedura izolacji zakończyła się utworzeniem kolekcji lizatów fagowych, które zostaną wykorzystane do dalszych etapów projektu.



Ryc. 16 Przykładowe zdjęcia przedstawiające płytki z murawą bakteryjną i lysinkami fagowymi o jednnorodnej morfologii (kształcie, wielkości), co świadczyło o tym, że wyizolowano pojedyncze szczepy bakteriofagów.

#### 4. Namnażanie poszczególnych bakteriofagów na skalę preparatywną i uzyskanie lizatów.

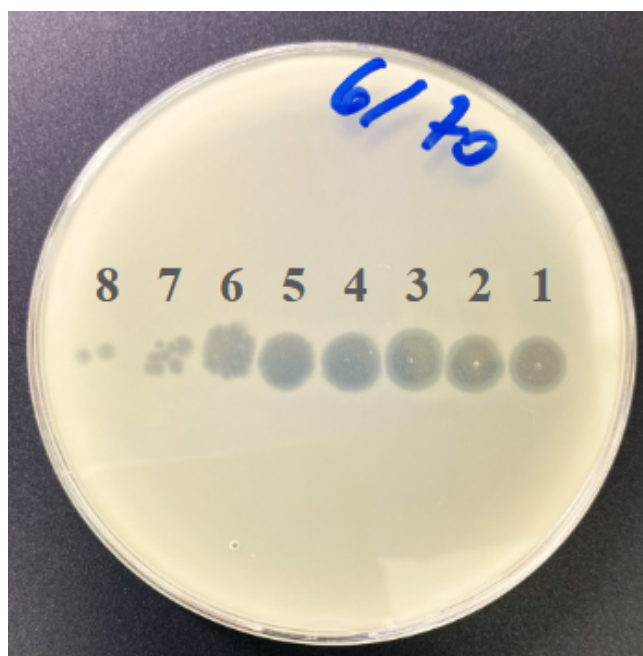
Kolejnym etapem projektu było namnażanie w skali preparatywnej jednnorodnych szczepów bakteriofagów. Każdy z nich został namnożony w skali preparatywnej w objętości 6 L oraz zagęszczony przy użyciu glikolu polietylenowego (PEG 8000) poprzez inkubację przez noc w 4°C przy użyciu mieszadła magnetycznego. Po nocnej inkubacji zawiesinę wirowano w temperaturze 4°C przy 8 000 x g przez 20 min. Kolejny etap procedury obejmował ekstrakcję cząstek wirusowych z zawiesiny przy zastosowaniu chloroformu. Cały proces miał na celu otrzymanie wysokiego miana fagów w możliwie małej objętości. Aby potwierdzić, uzyskanie lizatu fagowego o wysokim mianie, każdy z nich miareczkowano metodą kropelkową z zastosowaniem agaru dwuwarstwowego. W tym celu wykonano seryjne rozcieńczenia lizatów w buforze TM i nakrapiano na płytki z murawą bakteryjną. Płytki inkubowano przez noc w 37°C. Na podstawie poniższego wzoru obliczano miano faga i porównywano z mianem lizatów nie zagęszczonych.

$$\text{PFU/ml} = n \times 10^R \times 400$$

PFU/ml – liczba cząstek fagowych przypadająca na 1 ml

n – ilość łysek fagowych

$10^R$  – rozcieńczenie lizatu fagowego (R – krotność rozcieńczenia: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 itd.) 400 – wielkość przez którą należy pomnożyć wynik, gdyż nakrapiano 2,5  $\mu\text{l}$  każdego rozcieńczenia lizatu fagowego, a mimo lizatu podaje się na 1 ml roztworu



Ryc. 17 Przykład miareczkowania lizatu bakteriofagowego metodą kropelkową.

## 5. Oczyszczenie lizatów bakteriofagowych za pomocą ultrawierowania w gradiencie chlorku cezu.

W celu otrzymania ultraczystych lizatów bakteriofagowych przeprowadzono najbardziej wydajną metodę oczyszczania jaką jest ultrawierowanie w gradiencie chlorku cezu (CsCl).

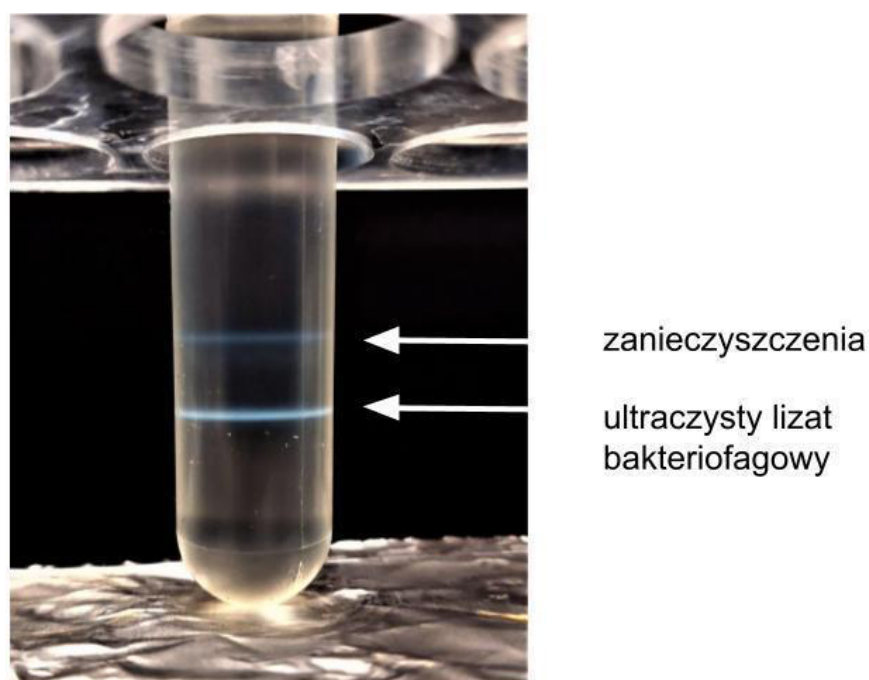
W specjalistycznych, jednorazowych probówkach wirowniczych został naniesiony gradient chlorku cezu złożony z trzech roztworów w objętości 1,5 ml o różnych stężeniach: 1,7 g/ml,

1,5 g/ml i 1,45 g/ml, na który następnie nałożono zagęszczony przy pomocy PEG 8000 lizat. Procedura była przeprowadzona z zachowaniem szczególnej ostrożności (każdy lizat osobno), tak aby nie doszło do kontaminacji (zakażenia) pomiędzy poszczególnymi lizatami.

Przygotowane w ten sposób lizaty zostały odwirowane przy pomocy specjalistycznej

ultrawirówki Optima XPN 80 - IVD (Beckman Coulter) w rotorze SW 32.1 Ti Bucket w warunkach 4°C przy 40 000 x g przez 2,05 h.

Efektem wirowania było uzyskanie ultraczystych lizatów bakteriofagowych pozbawionych zanieczyszczeń w postaci materiału genetycznego bakterii, białek czy błon bakteryjnych powstałych w procesie lizy przez fagi (ryc. nr 7). Dodatkowo metoda ta pozwala na zagęszczenie lizatu czyli otrzymanie faga o większej ilości fagów w 1 ml roztworu, niż przed procesem oczyszczania. Po wirowaniu prążek odpowiadający oczyszczonym fagom ściągnięto przy pomocy strzykawki i igły. Po czym lizat fagowy został umieszczony w specjalnym worku dializacyjnym (MWCO 3500) i poddany dializie wobec buforu TM zawierającego 300 mM NaCl, w celu usunięcia z lizatu chlorku cezu. Bufor wymieniany był dwa razy dziennie przez okres 8 dni. Po zakończeniu procedury oczyszczania sprawdzono miano bakteriofagów (miareczkowanie metodą kropelkową) oraz przygotowano preparaty pozwalające na wykonanie zdjęć przy pomocy mikroskopu elektronowego. Zdjęcia te będą wykonywane w 3 etapie projektu. Pozwalają one na określenie morfologii wirionów i pośrednio potwierdzają czystość i jednorodność preparatów.



*Ryc. 18 Przykładowe zdjęcie przedstawiające rozdział lizatu bakteriofagowego na frakcję ultraczystą oraz zanieczyszczenia.*

## **6. Przygotowanie banku ultraczystych lizatów bakteriofagowych.**

Rozdzielone do pojedynczych szczepów bakteriofagowych lizaty zostały odpowiednio opisane etykietą informacyjną (numer wewnętrzny, numer bakteriofaga i szczep bakterii na którym został wyizolowany) i przechowywane w 4°C oraz zabezpieczone poprzez wykonanie

konserw w glicerolu. W tym celu 0,5 ml poszczególnych lizatów o mianie co najmniej  $1 \times 10^9$ /ml wymieszano z 1 ml szczepu gospodarza o mianie  $1 \times 10^9$ /ml oraz 9 ml pożywki LB. Następnie próbkę inkubowano 20 minut w celu adsorpcji fagów, a następnie wirowano w temperaturze  $4^\circ\text{C}$  przy  $5\ 500 \times g$  przez 10 min. Supernatant odrzucono, a osad rozpuszczono w pożywce zawierającej 25% glicerol. Tak przygotowaną mieszaninę podzielono na porcje i zamrożono w  $-80^\circ\text{C}$ .

Każdy z lizatów został skatalogowany w osobnym dla każdej próby biologicznej pliku arkusza kalkulacyjnego excel. Informację o ilości kopii biologicznych oraz sposobie przechowywania znajdują się w katalogu.

Bank lizatów bakteriofagowych został wykonany z zachowaniem wszelkich środków bezpieczeństwa.



Ryc. 19 Przechowywanie prób w temperaturze  $+4^\circ\text{C}$  i  $-80^\circ\text{C}$ .

### ETAP III

Celem prac w okresie obejmującym miesiące kwiecień- lipiec 2024 było:

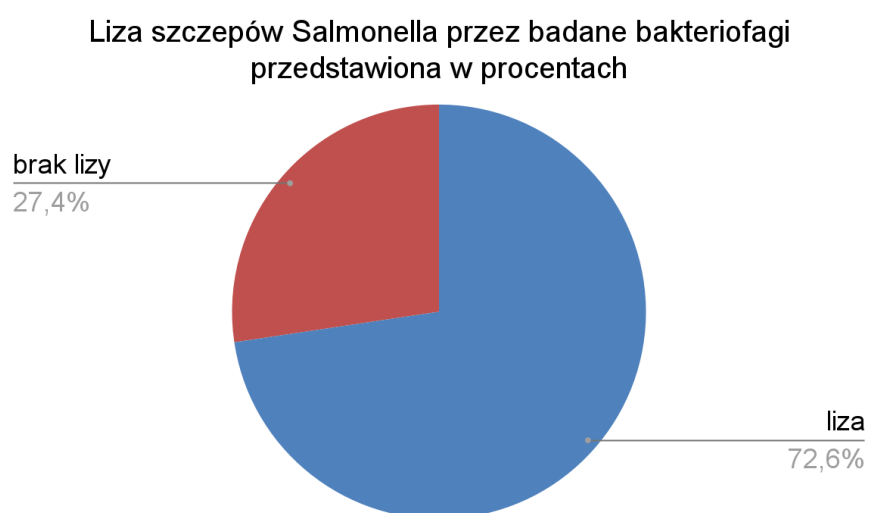
1. Określenie spektrum serowarów bakterii *Salmonella*, które każdy z bakteriofagów eliminuje.
2. Sprawdzenie stabilności bakteriofagów w temperaturze pokojowej oraz 4°C.
3. Sprawdzenie morfologii wyizolowanych fagów poprzez wykonanie zdjęć pod mikroskopem elektronowym.

1. Określenie spektrum serowarów bakterii *Salmonella*, które każdy z bakteriofagów eliminuje.

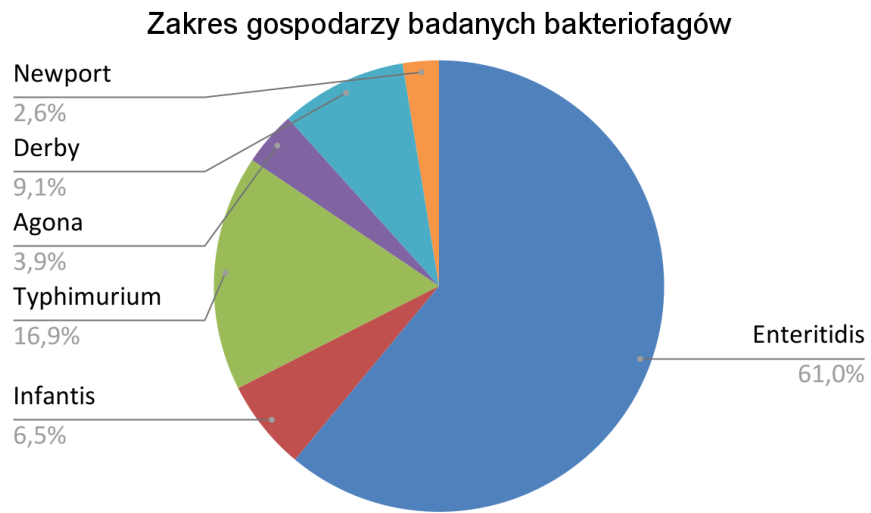
1. Określenie spektrum serowarów bakterii *Salmonella*, które każdy z bakteriofagów eliminuje.

Określenie spektrum gospodarza za pomocą miareczkowania metodą kropelkową na płytkach z dwuwarstwowym agarem pozwoliło ocenić skuteczność namnażania bakteriofaga na wyselekcjonowanych szczepach bakterii *Salmonella*. Aby potwierdzić lizę danego szczepu bakterii przez lizat fagowy wykonano jego seryjne rozcieńczenia w buforze TM i nakrapiano na płytki z murawą bakteryjną. Płytki inkubowano przez noc w 37°C, zgodnie z opisem metody (etap II, punkt 4). Eksperymenty zostały przeprowadzone w trzech powtórzeniach.

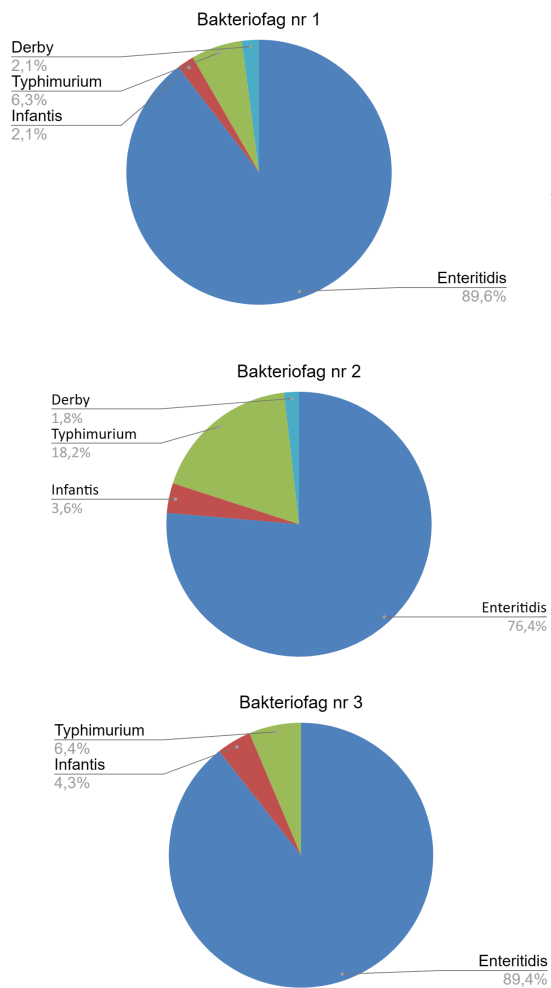
#### A



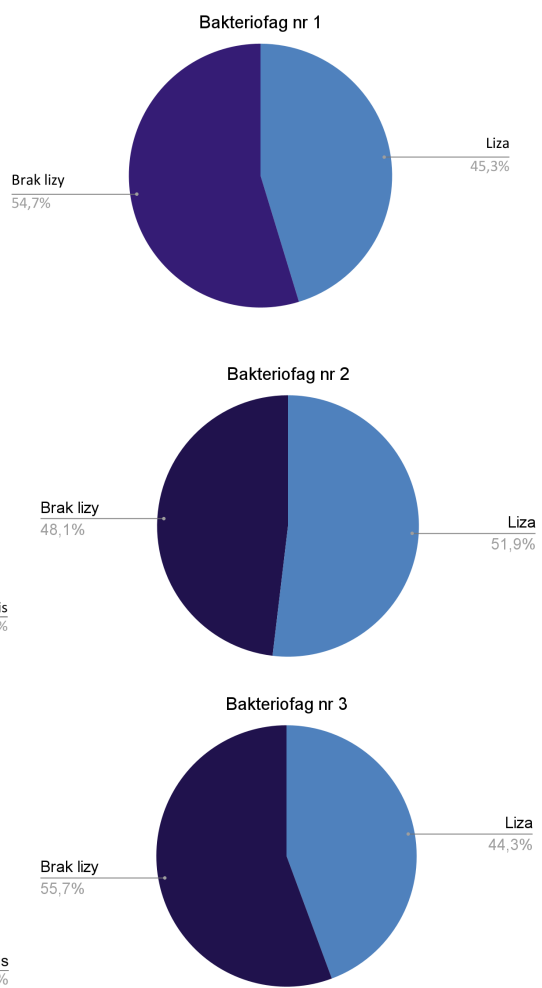
**B**

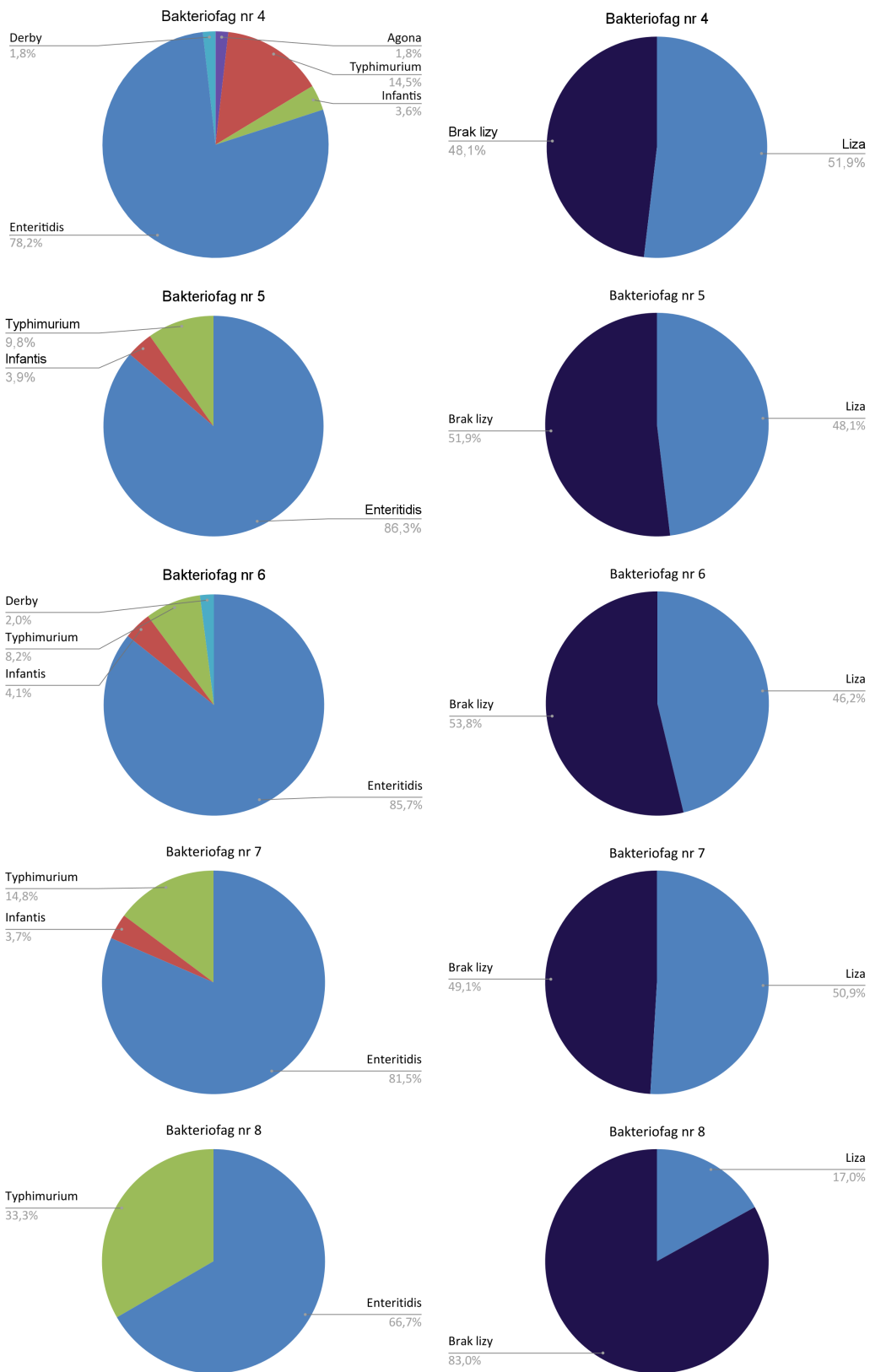


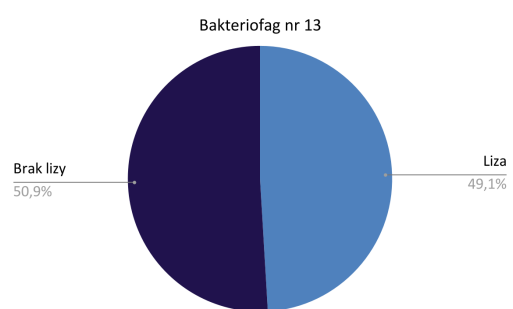
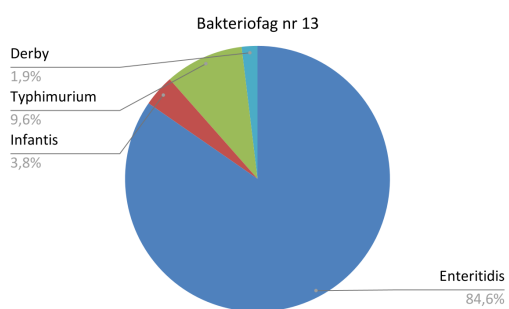
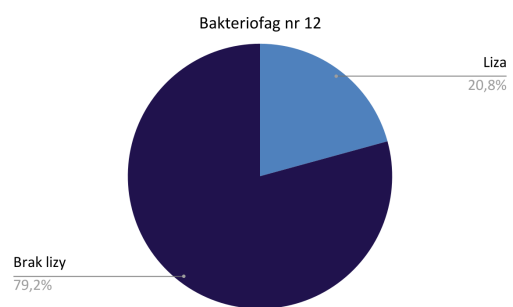
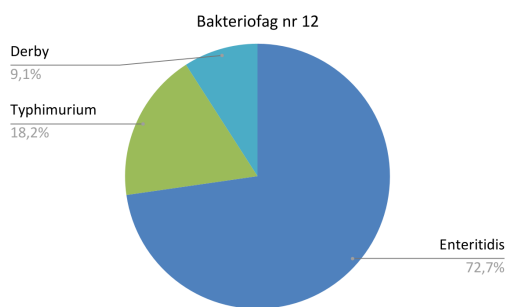
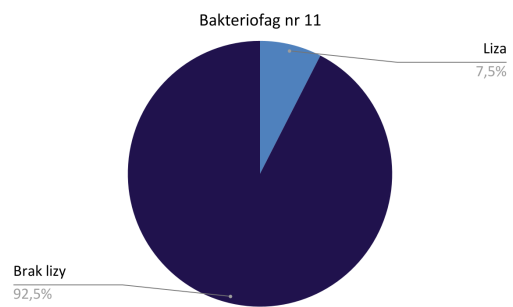
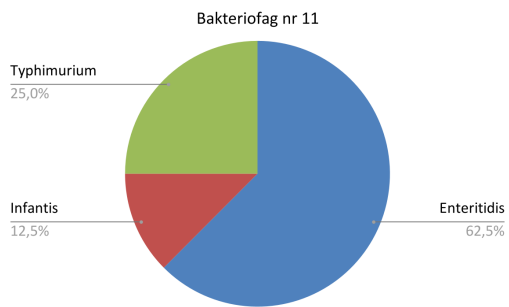
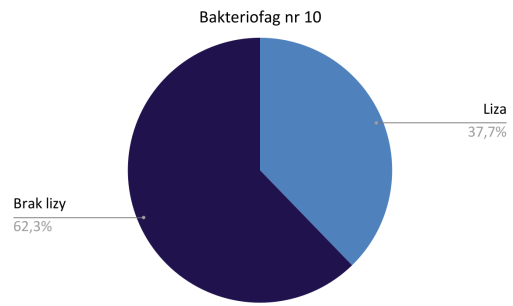
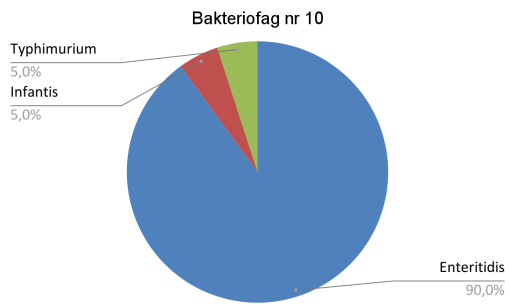
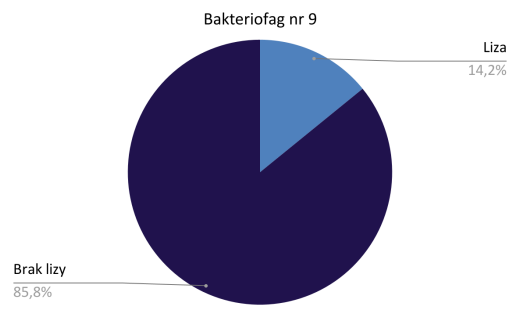
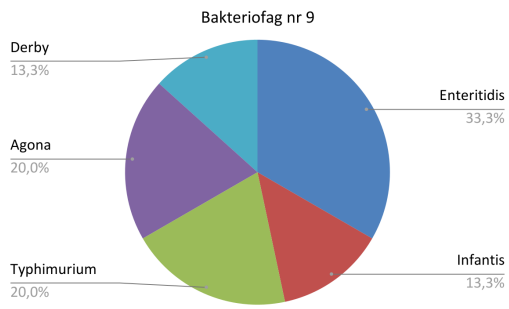
**C**

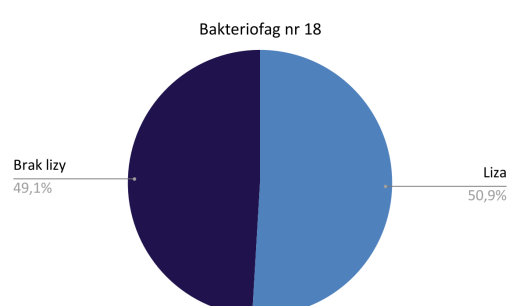
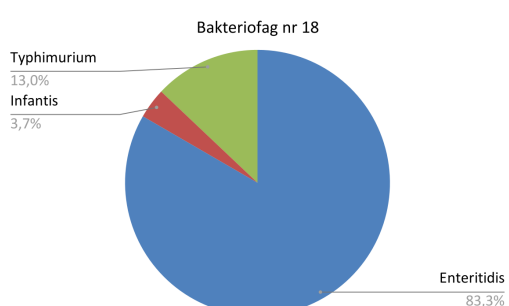
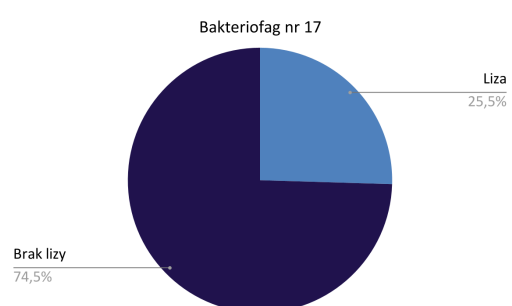
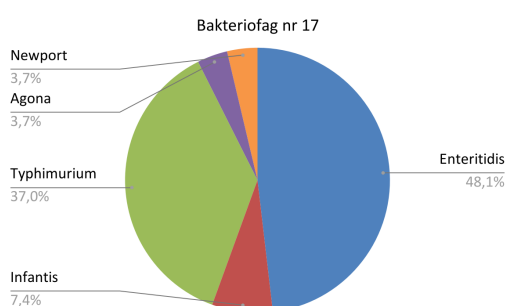
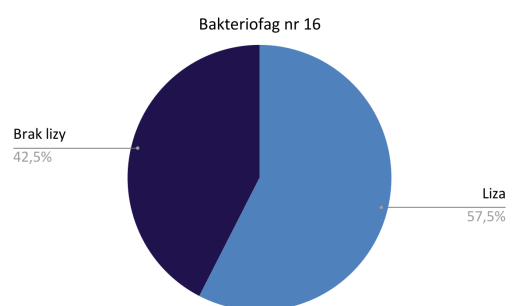
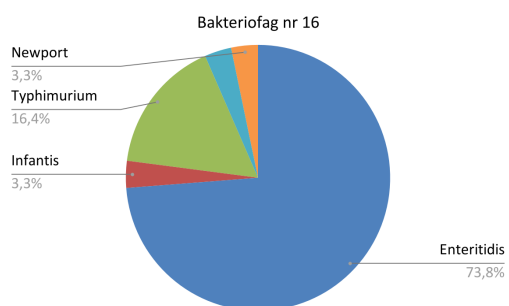
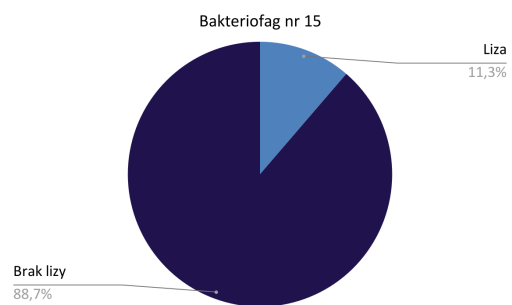
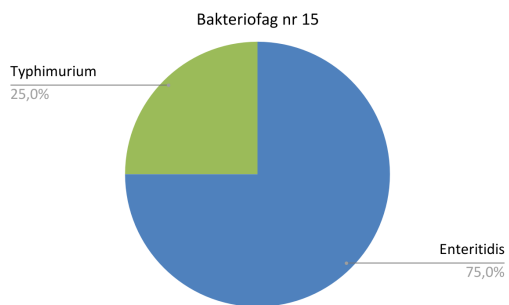
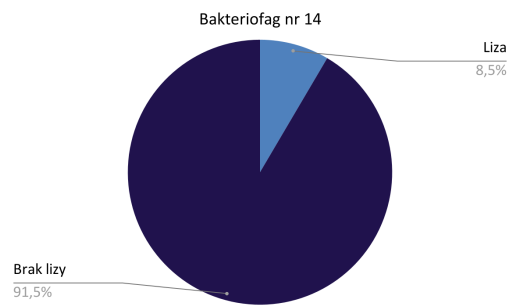
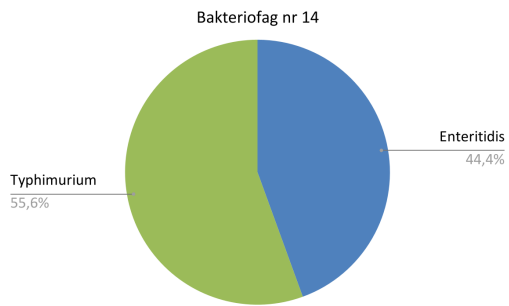


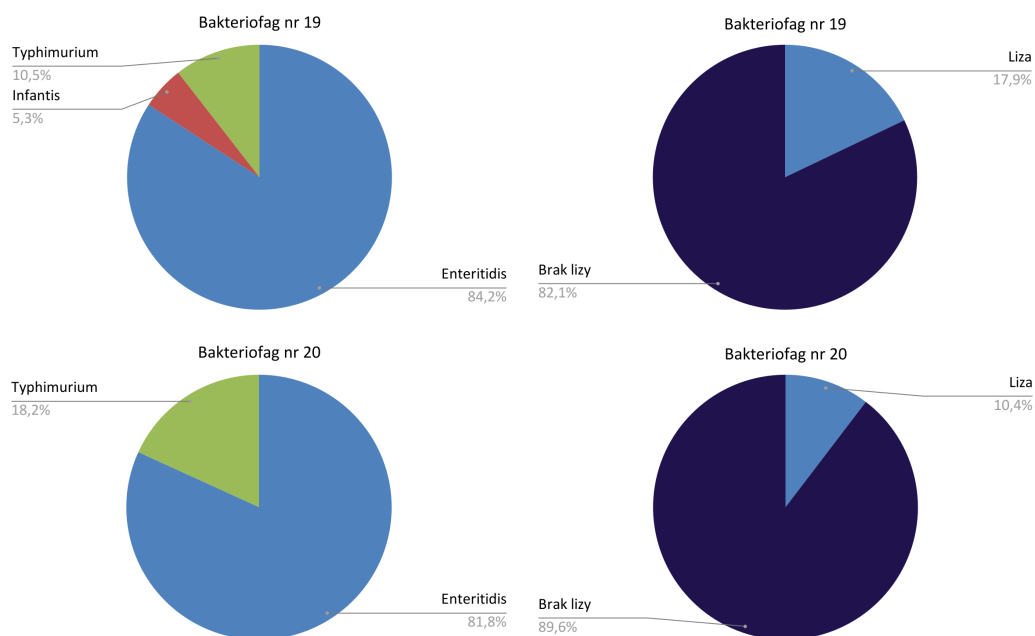
**D**











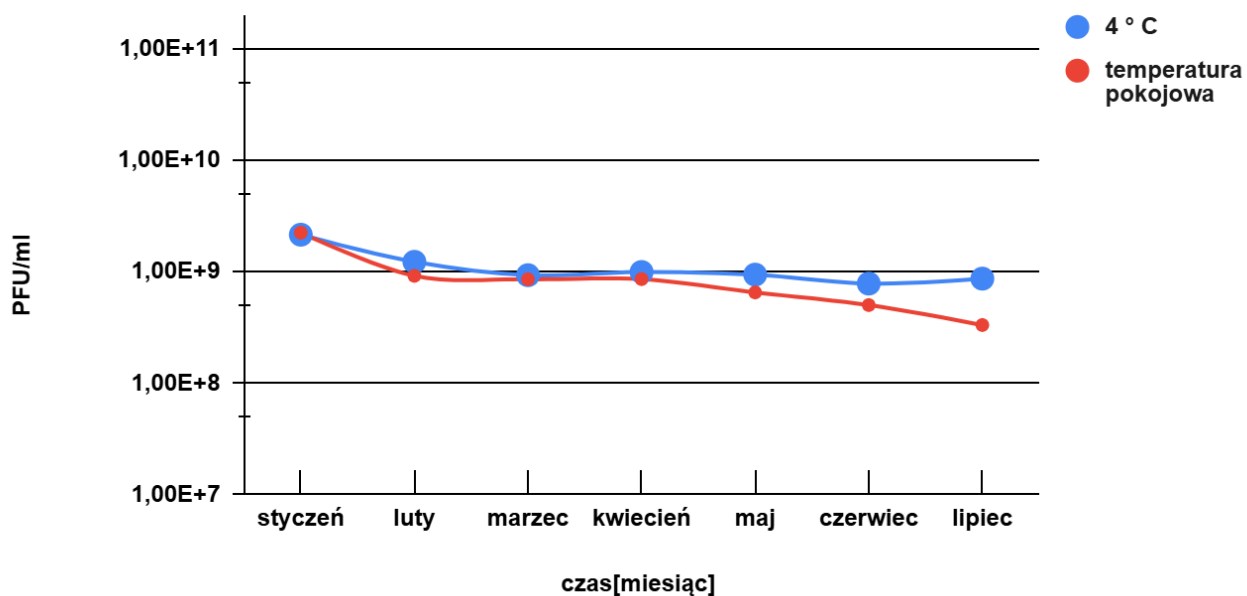
Ryc.20 Na wykresie w punkcie A został przedstawiony procentowy rozkład ilości szczepów bakteryjnych *Salmomella* pochodzących z banku kolekcji, podlegających lizie przez badane bakteriofagi (gdzie 100% odnosi się do 106 szczepów bakteryjnych). Wykres B przedstawia zakres gospodarzy podzielony na konkretne serowary dla wybranych bakteriofagów. Na wykresach w panelu C i D zawarte zostały dane dotyczące zakresu gospodarza każdego bakteriofaga z osobna. Panel C przedstawia zakres gospodarza z podziałem na serowary, natomiast D procentowy rozkład ilości lizowanych szczepów.

## 2. Sprawdzenie stabilności bakteriofagów w temperaturze pokojowej oraz 4°C.

Określenie stabilności wirusów bakteryjnych w temperaturze pokojowej oraz +4°C zostało przeprowadzone dla wybranych wcześniej lizatów fagowych.

Lizaty w objętości 1 ml zostały rozdzielone do kilku sterylnych probówek typu eppendorf, pokryte szczelnie parafilmem z odpowiednimi opisami umożliwiającymi łatwe przyporządkowanie próby. Tak przygotowane lizaty zostały umieszczone w odpowiednio opisanym pudełku zarówno w temperaturze pokojowej oraz w +4°C. Sprawdzanie żywotności wirionów zostało przeprowadzone co 30 dni za pomocą miareczkowania przy użyciu płytek dwuwarstwowych na szczepie gospodarza danego bakteriofaga w trzech niezależnych powtórzeniach.

### Przeżywalność bakteriofagów w temperaturze pokojowej oraz 4° C



Ryc. 21 Wykres przedstawia średnią przeżywalność badanych bakteriofagów w temperaturze +4°C oraz pokojowej.

### 3. Sprawdzenie morfologii wyizolowanych fagów poprzez wykonanie zdjęć pod mikroskopem elektronowym.



Ryc. 22 Wykres przedstawia procentowy podział badanych bakteriofagów ze względu na wielkość lub brak ogonka. Na potrzeby raportu dane zostały sklasyfikowane do dwóch grup (średnie ogonki: 0,10- 0,19 μm; długie ogonki: 0,20 μm).

## Podsumowanie:

Celem projektu było wyizolowanie bakteriofagów środowiskowych, które będą skutecznie eliminowały serowary bakterii *Salmonella* aktualnie występujące na terenie Polski (izolowane głównie z hodowli drobiu oraz zakładów przetwórstwa). Bakteriofagi izolowano z wody słodkiej, gleby, odchodów drobiu oraz ścieków. Najbogatszym źródłem fagów były ścieki. Łącznie wyizolowano 36 bakteriofagów a następnie sprawdzono ich zdolność do lizy poszczególnych szczepów bakterii *Salmonella* (106 szczepów bakterii *Salmonella*, których genomy zsekwencjonowano w pierwszym projekcie) w teście miareczkowania pełno-płytkowego. Bakteriofagi wyizolowane z wody słodkiej, gleby czy odchodów drobiu miały zwykle wąskie spektrum gospodarza czyli lizowały najczęściej kilka szczepów bakterii. Bakteriofagi izolowane ze ścieków komunalnych miały zdecydowanie szersze spektrum szczepów *Salmonella*, które eliminowały. Wyizolowane bakteriofagi lizują łącznie ponad 70% szczepów *Salmonella* z pierwszego projektu.

Zgodnie z wiedzą zespołu do dalszych badań zostało wybranych 20 bakteriofagów. Bakteriofagi nie wybrane pozostaną w kolekcji i będą przechowywane w  $-80^{\circ}\text{C}$ . Następnie sprawdzono stabilność bakteriofagów w temperaturze pokojowej oraz  $+4^{\circ}\text{C}$  w okresie od stycznia do lipca 2024 r.

Wszystkie bakteriofagi są stabilne zarówno w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$  jak i w temperaturze pokojowej co jest bardzo ważną informacją w kontekście warunków ich długotrwałego przechowywania.

Wszystkie bakteriofagi namnożono na skalę preparatywną i oczyszczono w gradiencie chlorku cezu. Po wirowaniu zebrano prążki odpowiadające super czystym lizatom fagowym i poddano je ośmio-dniowej dializie w celu usunięcia soli (chlorku cezu). Niewielką objętość super czystych preparatów 20 bakteriofagów przekazano do Pracowni Mikroskopii Elektronowej w celu wykonania zdjęć wirionów. Po analizie uzyskanych obrazów stwierdzono, że większość (80%) wyizolowanych fagów należy do rodziny fagów ogonkowych (*Codoviricetes*) a 20% do fagów bezoognkowych. Część bakteriofagów posiad długie ogonki co stwarza potencjalną możliwość wykorzystania ich przy utylizacji biofilmów bakteryjnych. Dodatkowo potwierdzono, że preparaty są jednorodne czyli składają się z jednego szczepu bakteriofaga.

Wszystkie wyizolowane bakteriofagi są dokładnie opisane, skatalogowane i przechowywane w  $+4^{\circ}\text{C}$  oraz  $-80^{\circ}\text{C}$  (jako konserwy z dodatkiem glicerolu oraz zamknięte wewnątrz komórek bakterii podczas ich cyklu rozwojowego).

Zrealizowano wszystkie zadania badawcze zawarte w projekcie pt. *„Badania naukowe mające na celu poprawę jakości mięsa drobiowego w Polsce – badania nad bakteriofagami zwalczającymi Salmonellę”*