

Diss. ETH No. 17240

**Virulent bacteriophages for control of
Listeria monocytogenes and
Salmonella Typhimurium in foods**

A dissertation submitted to
ETH Zurich

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Susanne Günther
Dipl.oec.troph. TU München
born February 20, 1978
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin Loessner, examiner
Prof. Dr. Leo Meile, co-examiner

2007

Summary

The use of bacteriophages represents an innovative and promising approach for control of spoilage bacteria and pathogens in foods. Bacteriophages can be considered as the natural enemies of bacteria. Phages are of natural origin, self-perpetuating, and can be highly host specific. Some of the critical issues of biopreservation with bacteriophages are a limited host range and the emergence of phage resistant mutants. In this study, the application of high specific and broad host range phages for control of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium was evaluated during storage and ripening of different foods.

In the case of *L. monocytogenes*, 14 different foods including meat, fish, and dairy products as well as vegetables were tested during storage. Three strains of *L. monocytogenes* were used, belonging to serovars 1/2a, 1/2b and 4b. Most experiments were done with *Listeria* phage A511, but two other phages (P100, P35) were also included in some trials. The initial contamination level of *L. monocytogenes* was usually about 1×10^3 cfu/g and the application level of the *Listeria* phage about 3×10^8 pfu/g. Various parameters such as storage temperature and time, initial bacterial cell and phage concentrations, and different phage application protocols were studied.

Compared to controls, a significant reduction of *L. monocytogenes* cell counts of 0.4 to 6.0 log units was observed in phage treated foods after storage at 6°C for six days. The effect of phage A511 was comparable for the different *Listeria* strains on most foods, except for raw salmon, minced meat and mozzarella cheese brine. When foods were contaminated with a lower concentration of *L. monocytogenes* (1×10^2 cfu/g), growth inhibition was similar or higher compared to the higher contamination level (1×10^3 cfu/g). The long-term effect of A511 was shown for all *Listeria* strains in three different foods during 13 days. However, in some of the experiments phage resistant bacteria were isolated. In these cases, control effect of phage A511 was lower. After increase of the storage temperature to 20°C, reduction levels were similar or higher than at 6°C. However, at 20°C, *Listeria* cells were able to resume growth after the first days, in contrast to 6°C. A higher initial phage concentration (3×10^8 pfu/g) yielded a better control effect of *L. monocytogenes* than lower ones (3×10^7 pfu/g or 3×10^6 pfu/g). The control effect of phage A511 was improved on smoked salmon by increasing the initial phage concentration to 2×10^9 pfu/g. Efficacy of phage P100 was comparable to that of phage A511, but efficacy of phage P35 seemed to be lower. Phage concentrations were stable on foods of animal origin during 6 or 13 days. On vegetables, counts of A511 decreased by 0.6 to 1.1 log units at 6°C, and 2.0 log units at 20°C. Concentration

of P100 decreased by 0.6 log on cabbage and that of P35 by 0.8 log units on iceberg lettuce. Application of phage A511 was further tested during the ripening of white mold soft cheese and red smear soft cheese. After 3 weeks, *Listeria* cell counts were significantly decreased by 2.5 log units on white mold cheese, using a single application of A511 with 3×10^8 pfu/cm². Repeated application of phage A511 could not improve growth suppression, but a higher single application of 1×10^9 pfu/cm² was slightly more effective. On red smear soft cheese, cell numbers were significantly reduced by 3.1 to 3.6 log units after 22 days. Repeated application of phage A511 could only delay re-growth of *L. monocytogenes*, but could not further improve the control effect after 22 days. Phage concentrations decreased by 1.5 log units on white mold cheese, whereas on red smear cheese phage A511 was stable.

For experiments with *S. Typhimurium*, two antibiotic-resistant strains were either naturally selected or genetically engineered, in order to enable the determination of *Salmonella* counts in foods. *Salmonella* phage FO1-E2 was tested for growth control on six different foods including meat, fish, and dairy products as well as vegetables, at two storage temperatures (8°C and 15°C). Contamination levels of *Salmonella* and concentrations of *Salmonella* phage FO1-E2 were similar to the experiments with *Listeria*. At 8°C, no *Salmonella* could be detected after the first day by direct plating, but with selective enrichment. At 15°C, bacterial cell numbers were significantly reduced by 3.0 to 5.3 log units compared to untreated control samples after 6 days. On mung bean sprouts, no significant reduction could be observed during the whole experiment. In egg yolk, growth inhibition was significant only at day 2. Phage FO1-E2 was stable on foods of animal origin, but decreased by 0.6 log units on vegetables during the 6 day period.

The work presented here clearly demonstrates that application of bacteriophages can contribute to the control of pathogens in foods. The effect of phages was mainly influenced by the type of food, the amount of phages applied, the stability of phages on the food, and the used phage. To a minor degree, growth control was dependent on the bacterial strain, the initial contamination level, the storage temperature and time. However, emergence of phage insensitivity may represent a potential problem. Therefore, mixtures of different virulent phage cultures should be used, and application protocols must be adjusted accordingly.

Zusammenfassung

Der Einsatz von Bakteriophagen stellt einen neuartigen und viel versprechenden Ansatz zur Kontrolle von bakteriellen Verderbs- und Krankheitserregern in Lebensmitteln dar. Phagen können als die natürlichen Feinde von Bakterien angesehen werden. Sie sind natürlichen Ursprungs, selbst-replizierend und können sehr wirtsspezifisch sein. Kritische Aspekte beim Einsatz von Bakteriophagen als biologische Konservierungsmittel sind deren oftmals eingeschränkte Wirtsbereiche und die mögliche Entstehung von gegen Phagen resistenten Bakterien. In dieser Arbeit wurde der Einsatz von hoch spezifischen Phagen mit einem weitem Wirtsspektrum zur Kontrolle von *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* Typhimurium während der Lagerung und Reifung verschiedener Lebensmittel evaluiert.

Zur Kontrolle von *L. monocytogenes* wurden 14 verschiedene Lebensmittel getestet (Fleisch-, Fisch-, Milchprodukte und Gemüse). Drei Stämme von *L. monocytogenes* der Serovare 1/2a, 1/2b und 4b wurden eingesetzt. Neben dem *Listeria* Phagen A511 wurden ebenfalls zwei weitere Phagen (P100 und P35) mit in die Experimente einbezogen. Die Anfangskontamination von *L. monocytogenes* lag bei 1×10^3 cfu/g und die Applikation der Phagen bei 3×10^8 pfu/g. Verschiedene Parameter wie die Lagerungstemperatur und -zeit, die Anfangskonzentration von Bakterien und Phagen sowie unterschiedliche Anwendungsverfahren der Phagen wurden untersucht.

Nach der Zugabe von Phage A511 zu verschiedenen Lebensmitteln wurde im Vergleich zu unbehandelten Kontrollproben eine signifikante Reduktion von 0.4 bis 6.0 Zehnerpotenzen von *L. monocytogenes* nach einer Lagerung von 6 Tagen bei 6°C beobachtet. Der Effekt von Phage A511 war für die unterschiedlichen Listerienstämme in den meisten Lebensmitteln vergleichbar, mit Ausnahme von rohem Lachs, Hackfleisch und Mozzarellalake. Wurden die Lebensmittel mit einer geringeren Listerienzellzahl kontaminiert (1×10^2 cfu/g), ergab sich im Vergleich zum höheren Kontaminationsgrad (1×10^3 cfu/g) eine ähnliche oder sogar stärkere Wachstumshemmung. Der Langzeiteffekt von A511 konnte für alle Listerienstämme in drei verschiedenen Lebensmitteln über einen Zeitraum von 13 Tagen gezeigt werden. Allerdings wurden in einigen dieser Experimente gegen Phagen resistente Bakterien entdeckt. In diesen Fällen war der Kontrolleffekt von A511 geringer. Eine Erhöhung der Lagerungstemperatur auf 20°C führte zu ähnlichen oder höheren Keimzahlreduktionen im Vergleich zur Lagerung bei 6°C. Jedoch konnten sich die Listerien bei 20°C im Gegensatz zu 6°C bereits nach den ersten Tagen erneut vermehren. Eine höhere Anfangskonzentration an Phagen (3×10^8 pfu/g) führte zur besseren Kontrolle von *L. monocytogenes* als die beiden

niedrigeren Konzentrationen (3×10^7 pfu/g or 3×10^6 pfu/g). Auf geräuchertem Lachs konnte der Effekt von A511 weiter verbessert werden, indem die Phagenkonzentration bis auf 2×10^9 pfu/g erhöht wurde. Die Effektivität von Phage P100 war vergleichbar mit der von A511, aber die Wirksamkeit von P35 schien geringer zu sein. Die Konzentration der Bakteriophagen war stabil auf allen tierischen Lebensmitteln während 6 oder 13 Tagen. Auf Eisbergsalat und Weisskohl wurde die Menge von A511 bei 6°C um 0.6 bis 1.1 Zehnerpotenzen verringert, und bei 20°C um 2 Zehnerpotenzen. Die Konzentration von P100 nahm um 0.6 Zehnerpotenzen auf Weisskohl ab und die von P35 um 0.8 auf Eisbergsalat. Die Anwendung von A511 wurde weiterhin während der Reifung von Weisseschimmelkäse und Rotschmirekäse getestet. Die einmalige Applikation von 3×10^8 pfu/g auf Weisseschimmelkäsen führte zu einer signifikanten Reduktion der Listerienkeimzahlen um 2.5 Zehnerpotenzen nach 3 Wochen. Eine mehrmalige Applikation von 3×10^8 pfu/g führte zu keiner signifikanten Verbesserung. Ebenfalls verbesserte eine einmalige Anwendung von 1×10^9 pfu/g die Wachstumshemmung nur geringfügig. Auf den Rotschmirekäsen wurden die Keimzahlen signifikant um 3.1 bis 3.6 Zehnerpotenzen nach 22 Tagen reduziert. Mehrmalige Anwendungen des Phagen A511 konnten das Listerienwachstum länger unterdrücken, aber keine Verbesserung der Kontrollwirkung nach 22 Tagen bewirken. Die Phagenkonzentrationen nahmen auf den Weisseschimmelkäses um 1.5 Zehnerpotenzen ab, waren dagegen auf den Rotschmirekäsen weitgehend stabil.

Für die Experimente mit *S. Typhimurium* wurden zwei Antibiotika resistente Stämme entweder natürlich selektiert oder genetisch modifiziert, um die Bestimmung der Keimzahl von *Salmonella* im Lebensmittel zu ermöglichen. Der Einsatz des Salmonellenphagen FO1-E2 wurde auf 6 verschiedenen Lebensmitteln (Fleisch-, Fisch-, Milchprodukte und Gemüse) bei 2 Lagerungstemperaturen (8 und 15°C) getestet. Die Kontaminationsrate von *Salmonella* und die Phagenkonzentration waren ähnlich zu den Experimenten mit *Listeria*. Bei 8°C konnten bereits nach dem ersten Tag keine Salmonellen mehr durch direktes Ausplattieren nachgewiesen werden, aber durch selektive Anreicherung. Bei 15°C wurden die Salmonellenkeimzahlen nach 6 Tagen signifikant um 3.0 bis 5.3 Zehnerpotenzen verringert im Vergleich zu unbehandelten Kontrollproben. Auf den Mungbohnsensprossen konnte während des gesamten Experiments keine signifikante Keimzahlreduktion beobachtet werden. In Eigelb war der Kontrolleffekt nur nach 2 Tagen signifikant. Phage FO1-E2 war stabil in tierischen Lebensmitteln, nahm jedoch während 6 Tagen um 0.6 Zehnerpotenzen auf den Mungbohnsensprossen ab.

Die hier vorgestellte Forschungsarbeit zeigt deutlich, dass die Anwendung von Bakteriophagen zur Kontrolle von bakteriellen Krankheitserregern in Lebensmitteln beitragen kann. Die Wirkung der Phagen war im Wesentlichen beeinflusst von der Art des

Lebensmittels, der eingesetzten Phagenmenge, der Phagenstabilität im Lebensmittel und dem verwendeten Phagentyp. Zu einem geringeren Ausmass war der Kontroll-effekt abhängig vom bakteriellen Stamm, der Höhe der Anfangskontamination sowie der Lagerungstemperatur und -zeit. Allerdings stellt die Entstehung von gegen Phagen resistenten Bakterien ein mögliches Problem dar. Deshalb sollten Mischungen verschiedener Phagen eingesetzt werden und die Anwendungsvorfahren entsprechend angepasst werden.