



Vědecký výbor pro potraviny

Klasifikace: Draft *Pro vnitřní potřebu VVP*
Oponovaný draft *Pro vnitřní potřebu VVP*
Finální dokument *Pro oficiální použití*
Deklasifikovaný dokument *Pro veřejné použití*

Název dokumentu:

STANOVISKO VĚDECKÉHO VÝBORU PRO POTRAVINY VE VĚCI:

Použití klostridiálních bakteriofágů při výrobě siláží

Poznámka:

Státní zdravotní ústav, Palackého 3a, 612 42 Brno
tel/fax +420541211764, URL: <http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/vvp.htm>

PREAMBULE

Stanovisko Výboru bylo připraveno v souladu s formální procedurou plynoucí z „Procedurálního manuálu Vědeckého výboru pro potraviny“. Stanovisko je konsensuální dokument, pokud není uvedeno jinak (zahrnutí minoritního názoru nebo variantního názoru). Stanovisko je veřejně přístupný dokument, pokud není na titulní straně dokumentu uvedeno jinak. Připomínky a názory k tomuto dokumentu je možné zasílat na sekretariát Výboru.

© Vědecký výbor pro potraviny

Všechna práva rezervována. Tento dokument Vědeckého výboru pro potraviny může být jako celek nebo jeho část reprodukován nebo překládán, pro nekomerční nebo komerční použití, pouze se souhlasem Vědeckého výboru pro potraviny (Státní zdravotní ústav, Palackého 3a, 612 42 Brno, tel/fax +420541211764, email: sekretariat@chpr.szu.cz). Další využití dokumentu není omezeno. Při citaci dokumentu by měl být vždy uveden kód publikace ze záhlaví tiskové strany. Za autory dokumentu se považují všichni členové Výboru bez určení prvního autora.

Členové Vědeckého výboru pro potraviny v abecedním pořadí:

J. Drápal, K. Ettlerová, J. Hajšlová, P. Hlúbik, M. Jechová, M. Kozáková, F. Malíř, V. Ostrý, J. Ruprich, J. Sosnovcová, V. Špelina, D. Winklerová.

Podkladový materiál pro jednání Výboru připravil:

V.Špelina, V.Ostrý, J.Ruprich

Klíčová slova:

klostridie, bakteriofág, siláž

1. VYMEZENÍ ÚKOLU A CHARAKTERISTIKA PROBLÉMU

Dne 24. 4. 2003 obdržel sekretariát Vědeckého výboru pro potraviny (VVP) ze sekretariátu Vědeckého výboru veterinárního (VVV) dopis Ing. Jiřího Zedníka, CSc. ředitele odboru krmiv ÚKZÚZ Brno (č.j. 80/03/K). Ing. Zedník v dopisu žádá Vědecké výbory, prostřednictvím Koordinační skupiny pro bezpečnost potravin na MZe ČR, o odborné stanovisko „k možnosti použití klostridiálního bakteriofágu jako součásti konzervantu pro silážování“.

V dopisu je položeno několik otázek. VVP pro potraviny z hlediska své kompetence se týkají následující otázky:

- 1. Do jaké míry lze očekávat, že tento bakteriofág bude působit přísně specificky, tj. pouze na klostridie**
- 2. Jaká rizika lze obecně očekávat při používání bakteriofágů**

Je třeba konstatovat, že ÚKZUZ ve svých dotazech o možnosti negativních účinků pro hospodářská zvířata, na životní prostředí a o případných obecných (zdravotních) rizicích při použití klostridiálních bakteriofágů při silážování neuvedl důvody, které by takové použití indikovaly nebo ospravedlňovaly. Soudíme, že spočívají v okolnostech stručně shrnutých v následujícím odstavci.

Při silážování rostlinného krmiva patří bakterie rodu *Clostridium* mezi nežádoucí mikroflóru. Za anaerobních podmínek fermentují uhlovodany a bílkoviny a krmivo tak znehodnocují. Popsána je také produkce biogenních aminů, které patří k toxickým látkám. Klostridia v siláži zhoršují kvalitu mléka, neboť jejich spory přežívají pasáž zažívacím traktem dojnice a mohou kontaminovat mléko. *Clostridium tyrobutyricum* rozkládá kyselinu mléčnou na kyselinu máselnou za tvorby plynu a tyto metabolické produkty velmi negativně ovlivňují proces výroby sýrů. Siláž může být kontaminována také *Clostridium botulinum*, které pochází např. z půdy nebo z mrtvého hlodavce nebo ptáka, a ohrozit tak život krmeného skotu.

Z technologie silážování jsou známy běžné preventivní prostředky, které do značné míry inhibují růst klostridií (a jiné škodlivé mikroflóry) a podporují žádoucí rozvoj bakterií mléčného kvašení. Kromě správného hygienicko-technického zajištění silážních prostor se jako aditiva užívají např. kyseliny mravenčí a mléčná, dusitany, siřičitany, chlorid sodný. Především však je žádoucí dodržovat zásady obsažené v platných a připravovaných předpisech (viz dále).

Použití klostridiálních bakteriofágů lze tedy chápat jako cílenou aplikaci antimikrobiálního prostředku ke zlepšení kvality a údržnosti silážovaného krmiva, případně k omezení zdravotních rizik skotu při krmení siláží, pravděpodobně v případech, kdy normální procesy fermentace siláže nejsou dodrženy nebo selhávají z důvodů zvýšené kontaminace klostridii.

2. PŘEHLED O STAVU PROBLÉMU

Výskyt, vlastnosti a využití bakteriofágů

Bakteriofágy jsou nebuněčné organismy obsahující nukleovou kyselinu (RNA, DNA) a jsou v živočišném traktu zvířat, půdě a přírodním prostředí, zejména ve vodách, nejméně tak četné jako bakterie. V některých případech, např. v krmivech, se jejich přítomnost považuje za indikaci fekální kontaminace. Rozmnožují se (replikují) pouze v hostitelských bakteriálních buňkách. Jsou většinou přísně druhově specifické a ve virulentní formě mohou být použity k omezování bakteriálních infekčních onemocnění zvířat, kdy se využívá jejich specifity, kterou se liší od často málo specifických antibiotik. Bakteriofágy tak selektivně ničí (lyzují) cílové buňky a nenapadají ostatní střevní mikrofloru zvířat. Jakmile jsou cílové bakterie zničeny, bakteriofág se mimo buňky dále nemůže rozmnožovat a je postupně z ošetřeného zvířete eliminován (www.nzige.canterbury.ac.nz/phagegroup.htm). Publikovány byly např. případy úspěšné redukce salmonelózy u prasat a kuřat nebo fagoterapie vodních živočichů a rostlin (redukce mikrobiální populace působící kažení ovoce) a spíše ojediněle i případy humánní terapie při úplném selhání léčby antibiotiky. University of Strathclyde Technology v Glasgowě se zabývá možnostmi použití dehydrovaných fágů k ochraně sklizně a do různých polymerů (celulóza, nylon, polypropylen) používaných v zemědělské a potravinářské výrobě.

Fágové specifity k bakteriím se využívá také jako diagnostického prostředku v mikrobiální genetice a klinické mikrobiologii, např. při tzv. fagotypizaci mnoha druhů bakterií, přičemž nejznámější je typizace salmonel. Výčet pozitivních vlastností bakteriofágů lze uzavřít jejich užitím v molekulární biologii pro studium sekvencování DNA a jejich proteinů. Pro výzkum dalšího využití bakteriofágů jako laboratorního a diagnostického prostředku, v zemědělském a potravinářském sektoru i v ochraně lidského zdraví byla ustavena skupina expertů The International Bacteriophage Genomics Group (www.meds.queensu.ca).

Fágem zprostředkovaný přenos genů

Kromě virulentních bakteriofágů existují fágy temperované, mírné. Tyto fágy hostitelskou bakteriální buňku nelyzují, ale svou NK se začleňují do jejího genomu, tj. do chromosomu nebo plasmidu jako tzv. profág. Tento jev je znám jako lysogenní konverze a následný stav jako lysogenie, kdy po indukci, vyvolané např. UV zářením nebo chemicky, dojde k uvolnění fágové nukleové kyseliny. Při indukci profága může být část chromosomální nebo plasmidové NK hostitelské bakterie „vystřižena“ (excise) a inkorporována do fágové NK, která je následně replikována a posléze dochází k lyzi hostitelské buňky s uvolněním fágových partikulí do prostředí. Tyto fágy nesoucí část bakteriální DNA, popř. RNA pak infikují jiné bakterie, kterým mohou předat genetický materiál z původní hostitelské lysogenní buňky. Celý tento proces je znám jako transdukce a vedle transformace (přijetí izolované DNA recipientní buňkou) a konjugace (přenos genetického materiálu – části plasmidu z donorové do recipientní buňky při jejich dočasném spojení) je významným mechanismem přenosu genů (gene transfer). Transdukce může být generalizovaná (přenos kteréhokoliv genu) nebo specializovaná (přenos určitých genů).

Specializovaná transdukce

Z hlediska charakterizace nebezpečí a zvažování potenciálních zdravotních rizik je významná specializovaná transdukce genů determinujících rezistenci vůči antibiotikům a genů kódujících tvorbu toxinů. Rozšiřující se rezistence k antibiotikům je v posledních letech opakovaně dokladována. Přímý vznik rezistence bakterií vůči antibiotikům a antimikrobně působícím látkám a její přenos cestou konjugace s předáním plasmidové DNK pravděpodobně významně převažují nad mechanismem transdukce. Nejznámější případy fágem zprostředkované patogeneze přenosem genů kódujících tvorbu exotoxinů bakterií jsou:

- Neurotoxiny *Clostridium botulinum* typu C a D jsou kódovány fágem; jakmile jsou buňky od profága „vyléčeny“, toxin již neprodukuje. Byl zjištěn rekombinantní gen z genů determinujících C a D toxiny a vytvářející nový typ neurotoxinu.
- *Clostridium novyi* je nositelem fága produkujícího α -toxin (u dobytka způsobuje infekční nekrotickou hepatitidu)
- Pyrogenní exotoxin *Streptococcus* a stafylokokové enterotoxiny jsou kódovány fágy
- Enterohaemorrhagické kmeny *Escherichia coli* obsahují toxin kódující bakteriofágy. Tyto kmeny jsou příčinou haemorrhagické kolitidy a hemolyticko -uremického syndromu (HUS)
- STx shiga toxin (verocytotoxin) atakující epitelální buňky střeva a způsobující haemorrhagickou kolitidu byl pozorován u více než 200 serotypů *E.coli*.
- *Corynebacterium diphtheriae* může být konvertován (lysogenizován) k produkci letálního tkáňového nekrotického toxinu
- Podobně je založena toxinogenita u *Vibrio cholerae* a *Shigella dysenteriae*

Aby byla efektivní, vyžaduje transdukce určitou minimální koncentraci fágových partikulí a odpovídajících bakteriálních hostitelských buněk. Je proto pravděpodobnější, že se uskutečňuje spíše v prostředí charakterizovaném vysokou hustotou buněk a dostatkem živin nebo vysokou metabolickou aktivitou, např. ve střevním traktu zvířat.

3. DISKUSE

Míra potenciálního rizika z přenosu genů

Uvedené případy charakterizují nebezpečí jako poměrně vysoké vzhledem k možným závažným zdravotním důsledkům. Skutečné nebo přesněji řečeno odhadované zdravotní riziko pak závisí na míře pravděpodobnosti, s jakou mohou výše uvedené procesy nastat. Obecněji pojaté zhodnocení rizika z přenosu, funkční integrace a genové exprese rekombinantní DNA bylo učiněno v nedávné době (Safety considerations of DNA in foods, ILSI 2002) v článku Food safety consequences of gene transfer.

Savčí buňky disponují mechanismy, které štěpí exogenní „obnaženou“ DNA. V potravinách je denně přijímáno velké množství nukleových kyselin, které však jsou v gastrointestinálním traktu většinou degradovány. Při pokusech na myších bylo zjištěno, že z DNA bakteriofága M 13 přetrvávají v GI traktu fragmenty DNA v rozsahu jen asi 1% až 2%, které by se mohly kovalentně vázat s DNA myší. Kromě toho příjemem cizí DNA nejvíce ohrožené buňky, buňky střevního epitelu, jsou z lidského střeva rychle ztraceny. Ačkoliv obecná kvantitativní data nejsou

k dispozici, protože přenos genů a jejich inkorporace a exprese jsou velice proměnlivé u různých organismů a za různých podmínek prostředí, je zřejmé, že jde o jevy velmi vzácné. Bylo vypočteno, že např. konzumace rajčat obsahujících gen pro rezistenci ke kanamycinu by mohla vést k předpokládanému nárůstu rezistence vůči kanamycinu střevních bakterií člověka s frekvencí $2,6 \times 10^{-13}$.

Jakékoli riziko spojené s konzumací DNA je nezávislé na původu DNA a její formě (např. rDNA) a původu, protože tělo zachází s každou DNA stejným způsobem. Rozklad DNA během trávení potravin a její pasáž gastrointestinálním traktem snižují pravděpodobnost, že intaktní geny schopné kódovat cizí bílkoviny budou vneseny do buněk střevní mikroflory. Pravděpodobnost funkční integrace DNA z tráveniny do střevní mikroflory a/nebo lidských buněk je považována za minimální. Je však vhodné a odpovídající principům předběžné opatrnosti, posuzovat otázky potravinové/krmivové bezpečnosti jako důsledek přenosu genů z potravin/krmiv do lidského/zvířecího organismu, případ od případu. Takové posuzování by mělo brát do úvahy důsledky exprese genů pro cizí bílkoviny, jakkoli je málo pravděpodobné, že by k takovému případu mohlo dojít. Zkoumání by mělo být založené na vlastnostech bílkovin a důkazech z dřívější expozice lidí. Nemohou-li být důsledky pro zdravotní nezávadnost potravin vyloučeny, pravděpodobnost přenosu genu, jeho integrace a exprese budou nutně vyžadovat další zkoumání.

Současná evropská legislativa

Legislativa týkající se krmiv a ochrany rostlin náleží spíše do kompetence výboru pro výživu zvířat a fytosanitárnímu, pro úplnost však i zde odkazujeme na základní předpisy týkající se otázek bezpečnosti a nezávadnosti krmiv, resp. rostlin.

Problematiku aditivních látek obecně upravují Směrnice č. 70/524/EEC o přídatných látkách v krmivech a Směrnice č. 87/153/EEC poskytující pokyny pro posuzování přídatných látek v krmivech. Prvně jmenovaná je doplněna Směrnicí č. 93/113/EC o používání a uvádění na trh enzymů, mikroorganismů a jejich preparátů ve výživě zvířat, jež však obsahuje ustanovení, že se nevztahuje na takovéto prostředky přidávané do siláže. Kromě toho ve výčtu mikroorganismů jsou uvedeny pouze bakterie a kvasinky. V roce 1997 bylo publikováno a 25.4.2003 upřesněno stanovisko Vědeckého výboru pro výživu zvířat Evropské komise o používání určitých mikroorganismů jako aditiv pro krmiva, avšak problematiku bakteriofágů rovněž neřeší.

Směrnice Rady č. 91/414/EEC o uvádění na trh prostředků na ochranu rostlin významně pozměněná směrnicí č. 2001/36/EC podrobně popisují kroky, které musí žadatel učinit dříve než smí takové prostředky použít. Kromě popisu, identifikace a charakterizace mikroorganismu je nutné znát jeho biologické vlastnosti a původ, popsat způsob účinku na cílový organismus i na další organismy, znát vývojová stadia mikroorganismu, mít informace o možných metabolitech (zvláště toxinech) a vztahu k antibiotikům, poskytnout informace o postupech dekontaminace a způsobech zacházení, skladování a opatřeních při nehodách (nutnost vypracovat tzv. bezpečnostní listy – safety data sheet), definovat metody analýzy mikroorganismu obsaženém v ochranném prostředku atd. Důraz je ve směrnici kladen zejména na získání dat o možných účincích předmětného mikroorganismu na zdraví lidí nebo zvířat formou studií akutní, subakutní nebo chronické toxicity, provedených podle mezinárodně uznávaných protokolů (OECD, USEPA aj.). K posouzení je třeba rovněž předkládat data a informace splňující požadavky Směrnice Rady č.90/679/EEC o ochraně pracovníků před riziky spojenými se zacházením s biologickými agens.

Obecné principy bezpečnosti potravin a krmiv definuje recentní nařízení Evropského parlamentu a Rady č.178/2002, kterým se stanoví všeobecné zásady a požadavky potravinové legislativy a

postupy v oblasti nezávadnosti potravin a krmiv. Zajištění vysoké úrovně ochrany lidského života a zdraví, případně s ohledem na ochranu zdraví a welfare zvířat (čl.5) se zakládá na analýze rizik (čl.6) a v případech, kdy přetrvává vědecká nejistota o posuzovaném problému, lze využít zásadu předběžné opatrnosti jako prozatímní opatření k řízení rizik pro zajištění vysoké úrovně ochrany zdraví do doby než dostatek vědeckých informací umožní ucelenější posouzení rizik (čl.7).

V podstatě opačný přístup vyplývá ze stanoviska Asociace amerických veterinárních lékařů (AVMA, 2002). Ta sice požaduje, aby možné dopady na lidské zdraví z používání antimikrobiálních prostředků byly podrobeny analýze rizika, která by vyhodnotila rizika i výhody pro zdraví zvířat a lidí, avšak deklaruje, že v současné době není dostatek důkazů, které by ospravedlňovaly legislativní zákaz použití antimikrobiálních látek při krmení dobytka. Přednostně však doporučuje preventivní opatření, která by minimalizovala potřebu použití těchto látek.

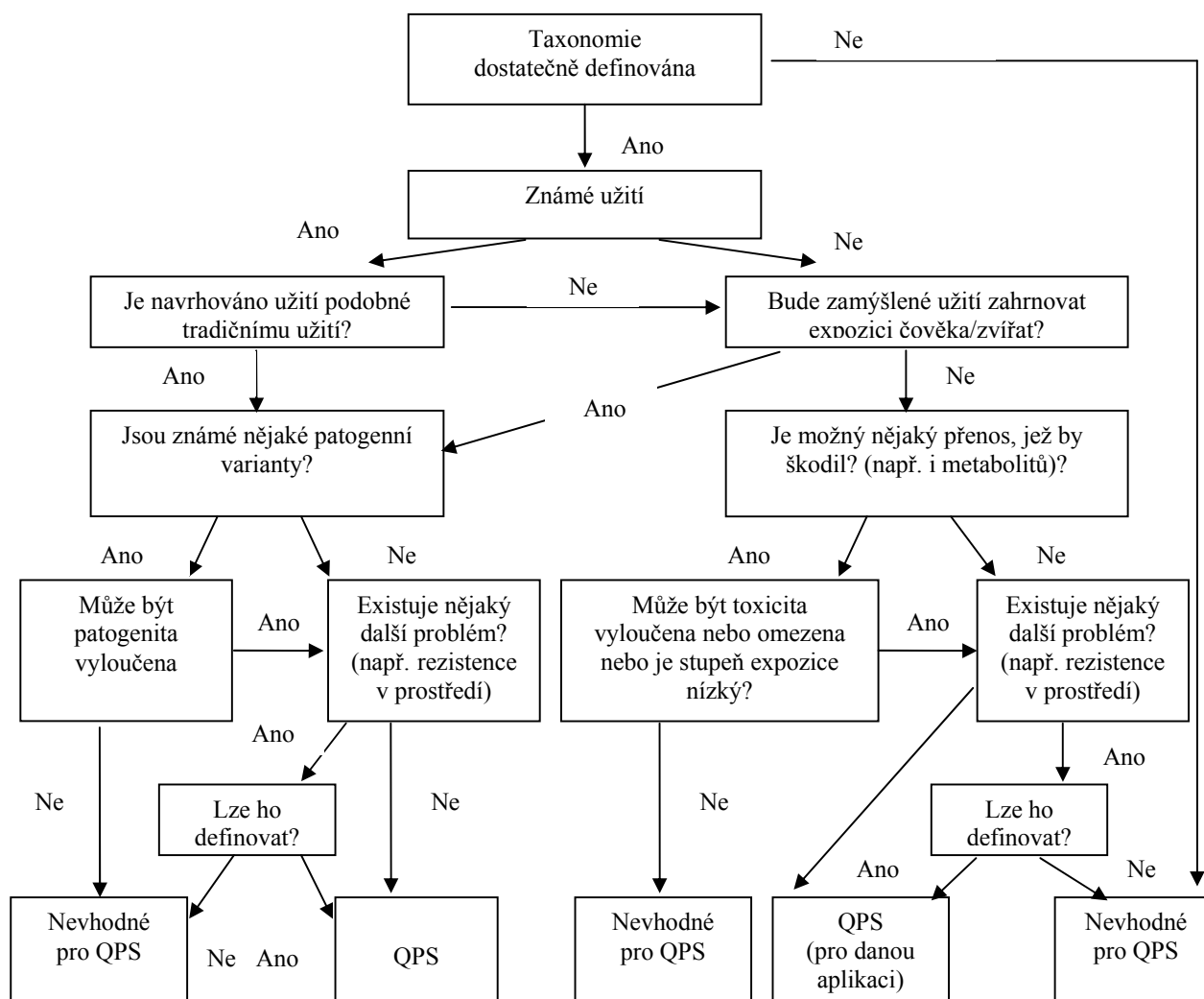
Související připravované předpisy v EU a v Codex Alimentarius Commission

V rámci Evropské komise je připravován návrh Nařízení o hygienických požadavcích na krmiva pro zvířata (Regulation on hygiene requirements for animal feed).

V rámci CAC je projednáván Draft Code on Good Animal Feeding (Codex CL 2003/14-AF /Alinorm 03/38A – Appenfix II/) obsahující sekci 6 On-farm production and use of feedingstuffs, a k němuž Evropská komise zpracovala komentář (CAC, CX/AF 03/05).

Pracovní skupina složená ze členů Vědeckého výboru pro výživu zvířat, Vědeckého výboru pro potraviny a Vědeckého výboru pro rostliny Evropské komise předkládá k připomínkám (do 30.6.2003) pracovní dokument On a generic approach to the safety assesment of micro-organisms used in feed/food and feed/food protection, který obsahuje významné návrhy na postupy obdobné přístupu známém v USA pod zkratkou GRAS (Generally Recognised As Safe). Navrhovaný rozhodovací přístup (QPS = Qualified Presumption of Safety = Kvalifikovaná presumpce bezpečnosti) se jeví jako vhodný i v případě posuzování bakteriálních fágů. Následující obecné schéma rozhodování hned v prvním kroku rozhodování vede k negativní odpovědi a tudíž ke kvalifikaci, že klostridiální fagy nejsou považovány a priori za bezpečné při produkci potravin/krmiv.

**Obecné schéma rozhodování o „Kvalifikované presumpci bezpečnosti“ (QPS) mikroorganismů
použitých k produkci potravin a krmiv**
(podle Working paper of EU DG SANCO, June 2003)



4. ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ

Vědecký výbor pro potraviny zevrubně prostudoval otázky použití bakteriofágů v souvislosti s výrobou potravin a krmiv. Po studiu podkladů se shodl v názoru, že v současnosti neexistuje dostatek vědeckých informací pro kvalifikované hodnocení zdravotního rizika použití klostridiálních bakteriofágů.

Vědecký výbor pro potraviny za dané situace nemůže kvalifikovaným způsobem odpovědět specificky na položené otázky.

Vědecký výbor pro potraviny konstatuje, že s využitím navrhovaného rozhodovacího schématu pro tzv. QPS, a s použitím principu předběžné opatrnosti, nelze v této chvíli prohlásit použití klostridiálního bakteriofága k produkci siláží za bezpečné.

Vědecký výbor pro potraviny dospěl k názoru, že před praktickým použitím klostridiálních bakteriofágů pro výrobu siláží je vhodné doložit důkazy o bezpečnosti v obdobném rozsahu, jako se činí v případě tzv. potravin nového typu (viz doporučení EK 97/618/EC). Uvedené doporučení může být pro žadatele rámcovým vodítkem pro přípravu podkladů o bezpečnosti technologie a produktu.

Vědecký výbor pro potraviny je dále toho názoru, že dodržování všech hygienických pravidel při výrobě krmiv musí být prioritou a pomocné prostředky (včetně uvažovaného bakteriofága) by měly být používány jen v souladu s předem stanovenými pravidly bezpečnosti. Ta nelze v daném případě stanovit bez dodání dalších vědeckých informací.

5. POUŽITÁ LITERATURA

1. Abedon, S. T. : Lysis and the Interaction between Free Phages and Infected Cells, 1994, s. 397-405. In: J. D. Karam (ed.), *Molecular Biology of Bacteriophage T4*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
2. Adamia, R. et al: The virulent bacteriophage IRA of *Salmonella typhimurium*: cloning of phage genes that are potentially lethal for the host cell. *J. Basic Microbiol.* 30, 1990, s. 707-716.
3. Barrow, P. A., Soothill, J. S.: *Bacteriophage Therapy and Prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of the potential*. *Trends Microbiol* 5, 1997, s. 268-271.
4. Bolsen, K.K., G. Ashbell, Wilkinson, J.M. : Silage additives. 1995, s. 33-54. In: R.J. Wallace and A. Chesson (ed.) *Biotechnology in animal feeds and animal feeding*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany.
5. Campbell, A. : The future of bacteriophage biology. *Nat Rev Genet.* 4(6), 2003, s. 471-477.
6. Carson, C.F., Riley, T.V. : Non-antibiotic therapies for infectious diseases. *Commun Dis Intell.* 27 Suppl., 2003, s.143-146.
7. Driehuis, F., Oude Elferink, S.J. : The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Vet Q.* 22(4), 2000, s. 212-216.
8. Driehuis, F., van Wikselaar, P.G. Effects of addition of formic, acetic or propionic acid to maize silage and low dry matter grass silage on the microbial flora and aerobic stability. 1996, s. 256-257. In: D.I.H. Jones, R. Jones, R. Dewhurst, R. Merry, and P.M. Haigh (ed.) *Proc. 11th Int. Silage Conference, Aberystwyth, UK. 8-11 September 1996*. IGER, Aberystwyth, UK.
9. Giffel, M.C., Wagendorp, A., Herrewegh, A., Driehuis, F.: Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81(1-4), 2002, s. 625-630.
10. Kemperman, R., Kuipers, A., Larsena, H., Nauta, A., Kuipers, O., Kok, J. : Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl Environ Microbiol.* 69 (3), 2003, s.1589-1597.

11. Klijn, N., Nieuwenhof, F.F., Hoolwerf, J.D., van der Wals, C.B., Weerkamp, A.H. : Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Appl Environ Microbiol.* 61(8), 1995, s. 2919-2924.
12. Kung Jr., L. : Use of additives in silage fermentation. 1996, s.37-42. In: *Direct-fed Microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium*, Miller Publishing Co., Minnetonka, MN, USA.
13. Lättemäe, P., and P. Lingvall: Effect of hexamine and sodium nitrite in combination with sodium benzoate and sodium propionate on fermentation and storage stability of wilted and long cut grass silage. *Swed. J. Agr. Res.* 26, 1996, s.135-146.
14. Levin, B., Bull J. J.: Phage Therapy Revisited: The Population Biology of a Bacterial Infection and its Treatment with Bacteriophage and Antibiotics. *The American Naturalist* 147, 1996, s. 881-898.
15. Maciorowski, K.G., Pillai, S.D., Rifle, S.C. : Presence of bacteriophages in animal feed as indicators of fecal contamination. *J Environ Sci Health B.*, 36 (5), 2001, s. 699-708. Ogunseitan, O.A., Sayler, G.S., Miller, R.V.: Application of DNA probes to analysis of bacteriophage distribution patterns in the environment. *Appl Environ Microbiol.* 58 (6), 1992, s. 2046-2052.
16. Merrill, C.R., Scholl, D., Adhya, S.L. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2(6), 2003, s. 489-497.
17. Merrill, C., Sankar A.: Long-circulating bacteriophages as antibacterial agents. *PNAS* 93, 1996, s. 3188-3192.
18. Oude Elferink, S.J.W.H., Driehuis, F., Krooneman, J., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F. *Lactobacillus buchneri* can improve the aerobic stability of silage via a novel fermentation pathway, the anaerobic degradation of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol. 1999, s. 266-267. In: T. Pauly (ed.) *Proc. 12th Int. Silage Conference*, Uppsala, Sweden, 5-7 July. 1999. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
19. Oude Elferink, S.J.W.H., Driehuis, F., Spoelstra S.F.: Improving aerobic stability of maize silage with heterofermentative lactic acid bacteria as inoculants. 1997, s. 130-131. In: V. Jambor, L. Klávil, P.Chromec, and P. Prochazka (ed.) *Proc. 8th Int. Symp. Forage Conservation*, Brno, Czech Republic. 29 Sept.-1 Oct. 1997. Research Institute of Animal Nutrition, Pohorelice, Czech Republic.
20. Saunders, M.E.: Bacteriophages in Industrial Fermentations. 1994, s. 116-121 in *Encyclopedia of Virology*, R. Webster and A. Granoff, ed. Academic Press.
21. Sparo, M.D., Mallo, R.A. : Evaluation of the bacterial flora in natural corn silage. *Rev Argent Microbiol.* 33(2), 2001, s.75-80.
22. Spoelstra, S.F. : Inhibition of clostridial growth by nitrate during the early phase of silage fermentation. *J. Sci. Food Agr.* 34, 1983, s.145-152.
23. Summers, W. C.: How Bacteriophage came to be Used by the Phage Group. *J. Hist. Biol.* 26, 1993, s. 255-267.
24. Vieu, J.-F., Guillermet, F., Minck R., Nicolle, P.: Donnees actuelles sur les applications therapeutiques des bacteriophages. *Bull. Acad. Natl. Med* 163,1979, 61.
25. Vieu, J.-F.: Les Bacteriophages. In *Traite de Therapeutique*, Vol. Serums et Vaccins. Fabre, J., ed. Flammarion, Paris, 1975, s. 337-340.
26. Wagner, D.L., Waldoz, M.K.: Bacteriophage control of bacteria virulence. *Infection and Immunity* 70, 2002, s. 3985-3993.
27. Weinberg, Z.G., Muck, R.E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.* 19, 1996, 53-68.

28. Woolford, M.K. : Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. J. Sci. Food Agr. 26, 1975, s. 229-237.
29. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. Official Journal L 031 , 01/02/2002 P. 0001 – 0024.
30. Council Directive 70/524/EEC of 23 November 1970 concerning additives in feeding-stuffs. Official Journal L 270 , 14/12/1970 P. 0001 – 0017.
31. Council Directive 87/153/EEC of 16 February 1987 fixing guidelines for the assessment of additives in animal nutrition. Official Journal L 064 , 07/03/1987 P. 0019 – 0028.
32. Council Directive 90/679/EEC of 26 November 1990 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual Directive within the meaning of Article 16 (1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L 374 , 31/12/1990 P. 0001 – 0012.
33. Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. Official Journal L 230 , 19/08/1991 P. 0001 – 0032.
34. Council Directive 93/113/EC of 14 December 1993 concerning the use and marketing of enzymes, micro- organisms and their preparations in animal nutrition. Official Journal L 334 , 31/12/1993 P. 0017 – 0023.
35. Commission Directive 2001/36/EC of 16 May 2001 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market (Text with EEA relevance). Official Journal L 164 , 20/06/2001 P. 0001 – 0038.