

## **Bakterie kwasu mlekowego (Slajd 2)**

Bakterie kwasu mlekowego (LAB) stanowią różnorodną grupę mikroorganizmów związanych z roślinami, mięsem i nabiałem. LAB są również ważne w handlu, w przetwórstwie mięs, produkcji napojów alkoholowych i warzyw. Są one wykorzystywane w przemyśle mleczarskim, do wytworzenia takich produktów jak mleko, jogurty, maślanki i sery.

## **Interakcje bakteriofag - gospodarz (Slajd 3)**

Bakterie kwasu mlekowego (LAB) zawierają różne grupy drobnoustrojów takich rodzajów jak *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, jak również gatunki z rodzajów o znaczeniu „przemysłowym”, jak na przykład *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc*. Rodzaj *Lactococcus* jest najlepiej scharakteryzowanym w przemyśle spożywczym mikroorganizmem należącym do LAB. Szczepy laktokoków są w stanie namnażać się w mleku i przekształcają laktozę do kwasu mlekowego. Są powszechnie stosowane w kulturach startowych fermentacji do produkcji sera na skalę przemysłową [1]. Pierwszy negatywny wpływ bakteriofagów na fermentację mleka odnotowano w połowie lat 30-tych 20 wieku [2]. Niezależnie od przestrzegania sanitarnych zaleceń, rotacji w szczepach startowych oraz stałego wprowadzania nowych szczepów opornych na fagi, bakteriofagi pozostają jednym z głównych i ekonomicznie najpoważniejszych źródeł niepowodzeń procesu fermentacji prowadzonego przez szczepy LAB. Fagi wywołują lizę komórek bakteryjnych, co skutkuje zatrzymaniem lub zwolnieniem procesu fermentacji, zmniejszeniem wytwarzania kwasu mlekowego i obniżeniem jakości produktów mlecznych, co w konsekwencji powoduje poważne straty ekonomiczne [3].

## **Koszmary producentów serów (Slajd 4):**

Przykład nagrany w mikroskopie optycznym filmu, w którym klatka po klatce wizualizowany jest, zachodzący podczas procesu fermentacji, szkodliwy efekt bakteriofagów. Zakażenie *Lactococcus lactis* wirulentnymi fagami może powodować lizę i śmierć komórek już w ciągu 1-ej godziny od infekcji.

## **Fagi LAB (Slajd 5)**

Fagi laktokoków są obecnie sklasyfikowane w dziesięciu grupach w oparciu o morfologię i podobieństwo genetyczne. W przemyśle mleczarskim najczęściej izolowane są trzy główne gatunki: 936, P335 i C2. Fagi 936 i C2 charakteryzują się cyklem litycznym, podczas gdy P335 może namnażać się w cyklu litycznym lub integrować z genomem gospodarza i powielać się razem z jego chromosomem. Scenariusz ten określa się jako lizogenię a fagi określa jako fagi łagodne [4].

## **Mechanizmy oporności na fagi (Slajd 6)**

Bakterie kwasu mlekowego oraz inne bakterie rozwinęły systemy obronne przeciwko bakteriofagom, które pozwalają im przetrwać w środowisku pełnym drapieżników (fagów). Systemy anty-fagowe zostały zorganizowane w grupy w zależności od sposobu, w jaki działają. Niektóre z tych systemów obejmują:

- (i) Hamowanie przyłączenia/adsorpcji fagów
- (ii) Blokowanie wstrzykiwania fagowego DNA
- (iii) Systemy restrykcji i modyfikacji
- (iv) Systemy fagowej infekcji poronnej/abortywnej

## **Bakteriofagi w mleczarni (Slajd 7)**

Ważne jest zidentyfikowanie potencjalnych źródeł zanieczyszczeń fagami i ograniczenie ich wprowadzenia do procesu fermentacji. Źródła zanieczyszczeń fagowych to:

## **Surowe mleko**

Surowe mleko jest najbardziej prawdopodobnym źródłem naturalnie występujących fagów litycznych w mianach tak niskich jak  $10^1$ - $10^3$  PFU ml<sup>-1</sup> i stanowi ciągłe źródło zanieczyszczenia zakładów mleczarskich [5,6]. Stężenie fagów w mleku surowym zależy również od warunków prawidłowego doju, przeładunku i przechowywania mleka przez dostawcę (gospodarstwo rolne), transportu do mleczarni oraz obsługi mleka w samej mleczarni. Ważne jest również, aby pamiętać, że bioróżnorodność fagów zwiększa się przez zlewanie mleka pochodzącego z różnych gospodarstw, a liczba ta może być nawet wyższa w później przetworzonym mleku.

## **Koncentrat białek serwatkowych**

Białka serwatki stosuje się do standaryzacji mleka przed procesem fermentacji lub polepszenia smaku i tekstury oraz wartości odżywczej produktu końcowego. Koncentraty białek serwatkowych mogą być źródłami fagów opornych na wysoką temperaturę i mogą wpływać na jakość produktu końcowego [7,8].

## **Kultury początkowe/startowe**

Sama kultura startowa może być źródłem fagów, gdy szczepy bakteryjne są lizogenne. Fagi łagodne wbudowują się do chromosomu bakteryjnego, a ich genom replikuje razem z genomem gospodarza. Profagi znajdują się w wielu szczepach LAB [9,10] i mogą być indukowane w trakcie produkcji z postaci profaga do postaci litycznej poprzez wysoką temperaturę, sole, kwasowość, bakteriocyny, głodowanie hodowli lub promieniowanie UV [11,12]. Hodowla seryjna fagów łagodnych w mleku może spowodować ich zastąpienie przez mutanta wirulentnego. Indukcja profagów ze szczepów starterowych posiadających wiele profagów może potencjalnie wpływać na fermentację. Głównym źródłem szczepów lizogennych są niezdefiniowane kultury, z dwóch głównych powodów: i) nieznana jest dokładna kompozycja szczepu startowego; ii) eliminacja szczepów lizogennych z niezdefiniowanej kultury jest bardzo trudna.

## **Wyposażenie/powietrze**

Fagi są powszechnie obecne na powierzchniach roboczych i zazwyczaj potrzebują obecności bakteryjnych gospodarzy. Z tego powodu są zwykle spotykane w miejscach, w których warunki rozwoju LAB są korzystne, takie jak zawory, szczeliny, końce linii produkcyjnych (miejsca trudne do czyszczenia i dezynfekcji). Przemysłowe przetwarzanie mleka surowego i serwatki w otwartych beczkach może prowadzić do rozprzestrzeniania się fagów w powietrzu. Fagi lityczne mogą krążyć w powietrzu również z dala od ich źródła ze względu na zdolność wiązania się z małymi cząstkami (<2,1  $\mu$ m) [13].

## **Strategia kontroli rozprzestrzeniania fagów**

### **Czyszczenie i dezynfekcja**

Podstawowe czynności czyszczenia i dezynfekcji są istotną częścią procesu przetwarzania mleka. Procedury dezynfekcji w miejscu pracy są zwykle stosowane na liniach produkcyjnych mleka [14]. W procesach czyszczenia można wyeliminować 90% lub więcej mikroorganizmów związanych z powierzchnią, niestety nie można ich wyeliminować całkowicie. Obecność LAB wśród nieusuniętych drobnoustrojów zwiększa prawdopodobieństwo zanieczyszczenia bakteriofagami.

### **Projektowanie systemu rotacji kultur startowych w oparciu o kontrolę zanieczyszczeń fagowych**

Kultury początkowe są kluczowym czynnikiem wpływającym na różnorodność populacji fagów w mleczarni. Zastosowanie nieokreślonych wielogatunkowych i wieloszczepowych kultur startowych było główną strategią pokonania problemów produkcyjnych związanych z fagami w wielu fabrykach w przeszłości. Strategia rotacji określonych hodowli wymaga wyboru szczepów bakteryjnych

opornych na szeroką gamę fagów, które mogłyby zastąpić szczepy zainfekowane bakteriofagi. Ponadto ciągła rotacja szczepów podczas procesów fermentacji ma wpływ na koewolucję fagów, co okazało się zwiększać ich różnorodność oraz liczebność w środowisku mleczarni [15]. System rotacyjny wymaga także ciągłego doboru szczepów starterowych o specyficznych właściwościach fermentacyjnych. Alternatywą jest zastosowanie jednego, wysoce wyspecjalizowanego szczepu opornego na fagi i jego wariantów zawierających plazmidy oporności na fagi uzyskane z naturalnie opornych szczepów.

### **Organizacja produkcji**

Ważnym elementem redukującym rozprzestrzenianie się fagów w mleczarni jest organizacja produkcji. Kontrola ryzyka wystąpienia fagów w mleczarniach polega na opracowaniu i wdrożeniu różnych procedur, takich jak techniki aseptyczne, zamknięte kadzie, media hamujące fagi i wprowadzenie obróbki cieplnej mediów startowych.

### **Uwagi końcowe**

Bakteriofagi stanowią stałe zagrożenie i powodują poważne straty w przemyśle mleczarskim. W wyniku tego mikrobiolodzy próbowali przez prawie 80 lat wyeliminować lub, co najmniej, kontrolować bakteriofagi, które zaburzają produkcję fermentowanych produktów mlecznych. Fagi szybko rozprzestrzeniają się w środowisku mleczarni i są trudne do wyeliminowania. Dlatego ważne jest, aby zrozumieć relacje fag - gospodarz w nadziei na znalezienie trwałych rozwiązań bieżącego problemu napotykanego w przemyśle mleczarskim.

## Literatura:

1. Klaenhammer TR, Barrangou R, Buck BL, Azcarate-Peril MA, Altermann E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29(3) 393-409.
2. Whitehead HR, Cox GA. The occurrence of bacteriophage in lactic streptococci. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 1935;16 319–320.
3. Lawrence R C. Action of bacteriophages on lactic acid bacteria: consequences and protection. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 1978;13 129-136.
4. Mahony, J., & van Sinderen, D. (2015). Novel strategies to prevent or exploit phages in fermentations, insights from phage–host interactions. *Current opinion in biotechnology*, 32, 8-13.
5. Kleppen HP, Bang T, Nes IF, Holo H. Bacteriophages in milk fermentations: diversity fluctuations of normal and failed fermentations. *International Dairy Journal* 2011;21(9) 592-600.
6. Madera C, Monjardin C, Suarez JE. Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Applied and Environmental Microbiology* 2004;70(12) 7365-7371.
7. Atamer Z, Ali Y, Neve H, Heller KJ, Hinrichs J. Thermal resistance of bacteriophages attacking flavor-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. *International Dairy Journal*, 2011;21(5) 327-334.
8. Chopin MC. Resistance of 17 mesophilic lactic *Streptococcus* bacteriophages to pasteurization and spray-drying. *Journal of Dairy Research* 1980;47(1) 131-139.
9. Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A, Brüssov H. Prophage genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2003;67(2) 238-276.
10. Mercanti DJ, Carminati D, Reinheimer JA, Quiberoni A. Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *International Journal of Food Microbiology* 2011; 144(3) 503-510.
11. Lunde M, Aastveit AH, Blatny JM, Nes IF. Effects of diverse environmental conditions on  $\phi$ LC3 prophage stability in *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology* 2005;71(2) 721-727.

12. Madera C, Garcia P, Rodriguez A, Suarez JE, Martinez B. Prophage induction in *Lactococcus lactis* by the bacteriocin Lactococcin 972. *International Journal of Food Microbiology* 2009;129(1) 99-102.
13. Verreault D, Gendron L, Rousseau GM, Veillette M, Masse D, Lindsley WG, Moineau S, Duchaine C. Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. *Applied and Environmental Microbiology* 2011;77(2) 491497.
14. Simoes M, Simoes LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology* 2010;43(4) 573-583.
15. Heap HA, Lawrence RC. The contribution of starter strains to the level of phage infection in a commercial cheese factor. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 1977;12(4) 213.