



Universitatea Tehnică a Moldovei

**EVALUAREA IMPACTULUI BACTERIOFAGILOR
ASUPRA PROCESULUI DE FERMENTARE A
LAPTELUI**

Student:

Polîşciuc Ana-Maria

Conducător:

**Popescu Liliana
conf. univ., dr.**

Chişinău, 2022

REZUMAT

Teza de master cu titlul: „Evaluarea impactului bacteriofagilor asupra procesului de fermentare a laptelui”, autor Polișciuc Ana-Maria, este structurată în modul următor: introducere, rolul bacteriofagilor în implementarea unui lanț durabil de procesare a laptelui, metode de identificare a bacteriofagilor, calitatea brânzei proaspete obținute prin fermentare acidă, monitorizarea bacteriofagilor în cadrul întreprinderilor de procesare a laptelui, concluzii, recomandări. Teza de master include: 60 pagini, 10 figuri, 15 tabele, 46 surse bibliografice.

Cuvinte-cheie: bacteriofagi, impact, fermentare, produse lactate, brânză proaspătă.

Problematica studiului: Bacteriofagii pot contamina produsele lactate iar acțiunea lor constă în lezarea bacteriilor din culturile selecționate, transformând laptele în materie prima improprie obținerii produselor lactate fermentate. Contaminarea cu bacteriofagi este periculoasă deoarece aceștia sunt rezistenți în timp și la temperaturi ridicate. Metodele de inactivare a bacteriofagilor utilizate în cadrul întreprinderilor de procesare a laptelui nu sunt complet eficiente atunci când sunt aplicate individual de aceea o combinație de tehnici este esențială pentru a obține un control adecvat al bacteriofagilor.

Scopul tezei: Evaluarea impactului bacteriofagilor asupra procesului de fermentare a laptelui în vederea minimizării riscului de oprire sau încetinire a procesului de fermentare a laptelui.

Rezultate concrete obținute: Analizând strategiile de prevenire a contaminării cu bacteriofagi în cadrul întreprinderilor de procesare a laptelui, au fost propuse următoarele metode de reducere a bacteriofagilor: utilizarea substanțelor dezinfectate cu acțiune antimicrobiană extinsă și asupra bacteriofagilor, rotația culturilor starter și utilizarea sistemelor antifagice.

Analizând mecanismele de acțiune ale sistemelor antifagice utilizate la nivel mondial se propune utilizarea sistemului CRISPR/Cas, astfel se va crea un sistem complex care va împiedica infectarea cu bacteriofagi pe tot parcursul procesului tehnologic de obținere a brânzei proaspete.

În cadrul tezei de master a fost elaborat planul de calitate la producerea brânzei proaspete, accentul fiind pus pe monitorizarea bacteriofagilor.

În urma studiilor efectuate s-a ajuns la concluzia că toate metodologiile disponibile utilizate în cadrul întreprinderilor de procesare a laptelui nu sunt complet eficiente atunci când sunt aplicate individual, iar o combinație de tehnici este esențială pentru a obține un control adecvat al bacteriofagilor.

SUMMARY

Master's thesis: "Evaluation of the impact of bacteriophages on the milk fermentation process", author Polișciuc Ana-Maria, it is structured as follows: introduction, the role of bacteriophages in the implementation of a sustainable milk processing chain, methods for identifying bacteriophages, the quality of fresh cheese obtained by acid fermentation, monitoring of bacteriophages in milk processing enterprises, conclusions, recommendations.

The master's thesis includes: 60 pages, 10 figures, 15 tables, 46 bibliographic sources.

Keywords: bacteriophages, impact, fermentation, dairy, fresh cheese.

Problems of the study: Bacteriophages can contaminate dairy products and their action is to damage the bacteria in selected crops, turning milk into a raw material unsuitable for obtaining fermented dairy products. Contamination with bacteriophages is dangerous because they are resistant to weather and high temperatures. The methods of inactivating bacteriophages used in milk processing enterprises are not fully effective when applied individually, so a combination of techniques is essential to achieve adequate control of bacteriophages.

The aim of the thesis: To evaluate the impact of bacteriophages on the milk fermentation process in order to minimize the risk of stopping or slowing down the milk fermentation process.

The purpose of the thesis: Analyzing the strategies for preventing bacteriophage contamination in milk processing enterprises, the following method of reduction to bacteriophages was proposed: use of disinfected substances with antimicrobial action antimicrobial starters asymilemia antimicrobial use extruded silo culture starters.

Analyzing the mechanisms of action of antiphage systems used worldwide, it is proposed to use the CRISPR / Cas system, thus creating a complex system that will prevent infection with bacteriophages throughout the technological process of obtaining fresh cheese.

In the master's thesis, the quality plan for the production of fresh cheese was elaborated, the emphasis being on the monitoring of bacteriophages.

Studies have shown that all available methodologies used in milk processing enterprises are not fully effective when applied individually, and a combination of techniques is essential to achieve adequate control of bacteriophages.

CUPRINS

INTRODUCERE.....	8
1. ROLUL BACTERIOFAGILOR ÎN IMPLEMENTAREA UNUI LANȚ DURABIL DE PROCESARE A LAPTELUI	10
1.1 Surse de contaminare a laptelui cu bacteriofagi.....	10
1.2 Bacteriofagii litici ca metodă alternativă de control al bacteriilor patogene.....	15
1.3. Inactivarea bacteriofagilor din lactate prin tratamente termice și chimice	20
1.4 Concluzii capitolul 1.....	23
2. METODE DE IDENTIFICARE A BACTERIOFAGILOR.....	25
2.1 Metode de detectare directă a bacteriofagilor.....	25
2.2. Metode de detectare indirectă a bacteriofagilor	27
3. CALITATEA BRÂNZEI PROASPETE OBTINUTE PRIN FERMENTARE ACIDĂ..	29
3.1. Caracteristicile senzoriale și fizico-chimice ale brânzei.....	29
3.2. Criteriile microbiologice și de siguranță ale brânzei.....	32
3.3. Procesul tehnologic de obținere a brânzei proaspete prin fermentarea acidă.....	34
4. MONITORIZAREA BACTERIOFAGILOR ÎN CADRUL ÎNTREPRINDERILOR DE PROCESARE A LAPTELUI.....	39
4.1. Strategiile de prevenire a contaminării cu bacteriofagi în cadrul întreprinderilor de procesare a laptelui.....	39
4.2. Plan privind controlul bacteriofagilor în producerea brânzei proaspete	50
CONCLUZII.....	56
BIBLIOGRAFIA	57

INTRODUCERE

Piața brânzeturilor se confruntă cu o puternică concurență internațională, optimizarea proceselor de producție devine mai importantă pentru succesul economic al companiilor lactate.

Au fost implementate diverse strategii în lactate pentru a minimiza riscul de eșecuri ale fermentației cauzate de bacteriofagi în industria laptelui [1]. Procesele de tratament termic la combinații definite de temperatură / timp au fost utilizate pentru inactivarea fagilor termorezistenți intrinseci în lapte, zer sau produse din zer [2]. Tulburările de fermentație pot fi imprevizibile, făcând procesul de producție instabil. În general, nu se produce un eșec total al loturilor de fermentație, atunci când se utilizează culturi inițiale cu tulpini mixte și regimuri de rotație a culturilor. Cu toate acestea, întârzieri în producție și variații ale calității produsului sunt întâlnite frecvent. Pentru eliminarea fagilor, atât inactivarea fiabilă a fagilor termorezistenți, cât și conservarea proteinelor native sunt provocări cruciale.

Bacteriofagii pot liza microorganismele din culturile starter folosite în fermentație sau în unele procese de biosinteză. Ceea ce va conduce la întârzierea sau chiar oprirea procesul de fermentare, ducând la produse de calitate scăzută. În cazuri mai grave, produsele supuse fermentării trebuie aruncate. Însă unele studii recente concluzionează că bacteriofagii ar putea fi utilizate în prevenirea contaminării produselor alimentare cu bacterii patogene.

S-a raportat că fagii bacteriilor *Lactococcus lactis* prezintă o rezistență termică extremă, iar tipurile acestor fagi nu sunt afectate în mod semnificativ după pasteurizare (la scurt timp) [2]. Astfel, fagii pot intra din nou în procesul de fabricație a brânzeturilor. Există riscul ca fagii să se înmulțească cu un număr mare în timpul producției.

După cum se știe, toate metodologiile disponibile utilizate în cadrul întreprinderilor de procesare a laptelui nu sunt complet eficiente atunci când sunt aplicate individual, iar o combinație de tehnici este esențială pentru a obține un control adecvat al fagilor. Fagii bacteriilor lactice virulenți sunt încă o preocupare industrială serioasă, iar producătorii duc o adevărată ”luptă” împotriva acestor virusuri pentru a-i ține sub control.

Industria produselor lactate se bazează pe o serie de măsuri pentru a controla acest fenomen natural, inclusiv proiectarea adaptată a fabricii, igienizarea corespunzătoare, ventilația adecvată, utilizarea tulpinilor de bacterii lactice rezistente la bacteriofagi, programe de rotație a culturilor starter etc.

În ciuda acestor eforturi, fagii evoluează și continuă să apară noi variante. Astfel, este esențial să se identifice noi strategii de control pentru a ține pasul cu evoluția fagilor. Acest domeniu de cercetare este acum implicat în abordări integrate de biologie a fagilor pentru a înțelege în continuare diversitatea fagilor și interacțiunile gazdă-virus cu speranța de a

îmbunătăți procesul de selecție a tulpinii bacteriilor lactice și de a optimiza mecanismele antifagice.

Chiar dacă tratamentele termice sunt instrumente foarte valoroase în controlul fagilor, selectarea temperaturii / timpului va depinde de caracteristicile dorite ale produsului final și de tehnologiile implicate în fiecare proces de fabricație. Tratamentele termice critice necesare pentru inactivarea completă a fagilor extrem de termorezistenți nu sunt practic aplicabile în procesele lactate, deoarece acest lucru ar duce la o deteriorare pronunțată a produsului final.

În special, inactivarea termică este cel mai frecvent tratament aplicat pentru a elimina majoritatea microorganismelor prezente, inclusiv a celor care provoacă deteriorarea și agenții patogeni, asigurând astfel o calitate înaltă și o durată de valabilitate mai mare pentru produsul final.

Prin urmare, **scopul tezei de master** constă în evaluarea impactului bacteriofagilor asupra procesului de fermentare a laptelui în vederea minimizării riscului de oprire sau încetinire a procesului de fermentare a laptelui.

În vederea realizării scopului dat au fost formulate următoarele obiective:

- studierea și identificarea surselor de contaminare a laptelui cu bacteriofagi;
- utilizarea bacteriofagilor litici ca metodă alternativă de control al bacteriilor patogene;
- studierea metodelor de inactivare a bacteriofagilor din lactate prin tratamente termice și chimice;
- studierea metodelor de detectare directă și indirectă a bacteriofagilor;
- prezentarea caracteristicilor senzoriale și fizico-chimice ale brânzei proaspete;
- prezentarea criteriilor microbiologice și de siguranță ale brânzei proaspete;
- elaborarea diagramei fluxului tehnologic de producere a brânzei proaspete prin fermentarea acidă;
- identificarea strategiilor de prevenire a contaminării cu bacteriofagi în cadrul întreprinderilor de procesare a laptelui;
- elaborarea planului privind controlul bacteriofagilor în producerea brânzei proaspete.

BIBLIOGRAFIE

1. CARMINATI, D. GIRAFFA, G., ZAGO, M., MARCO, M. B., GUGLIELMOTTI, D., BINETTI, A., REINHEIMER, J. Lactic acid bacteria for dairy fermentations: Specialized Starter Cultures to improve dairy products. *Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in agricoltura*, Italy.
2. ATAMER, Z., ALI, Y., NEVE, H., HELLER, K. J., HINRICHS, J. Thermal resistance of bacteriophages attacking flavour-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. *International dairy journal*, 2011.
3. EMOND, E. MOINEAU, S. Bacteriophages and food fermentations. Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology. Edited by: Stephen Mc Grath and Douwe van Sinderen. Caister Academic Press, U.K. 2007.
4. SURONO, S., HOSONO, A., FUQUAY, J., FOX, P., Mc SWEENEY, P. Starter cultures. Encyclopedia of dairy science 2° Edition (Volume 2), Academic Press, Elsevier Science, USA, 2011, 477-482.
5. MÜLLER-MERBACH, M., PETER, K., WEIDENDORFER, K., HINRICHS, J. Diffusion of bacteriophages in an agar gel and in a fermented milk matrix. *Milchwissenschaft*, 2007, 62, 24-27.
6. DEL RIO, B., BINETTI, A. G., MARTÍN, M.C., FERNANDEZ, M., MAGADÁN, A.H., ALVAREZ, M. A. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol*, 2007, 24, 75-81.
7. MADERA, C., MONJARDIN, C., SUAREZ, J. E. Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70, 7365-7371.
8. ATAMER, Z., DIETRICH, J., MÜLLER-MERBACH, M., NEVE, H., HELLER, K. J., HINRICHS, J. Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *Int Dairy J*, 2009, 19, 228-235.
9. HINRICHS, J. Mediterranean milk and milk products. *Eur J Nutr*, 2004, 43, 12-17.
10. CHOPIN, M. C. Resistance of 17 mesophilic lactic *Streptococcus* bacteriophages to pasteurization and spray-drying. *J Dairy Res*, 1980, 47, 131-139.
11. HENNING, D.R., BAER, R.J., HASSAN, A.N., DAVE, R. Major advances in concentrated and dry milk products, cheese, and milk fat-based spreads. *J Dairy Sci*. 2006, 89, 1179-1188.
12. ATAMER, Z., SAMTLEBE, M., HELLER, K. J., HINRICHS, J. Review: elimination of bacteriophages in whey and whey products. *Front Microbiol*, 2013, 4, 191.

13. VERREAULT, D., MOINEAU, S., DUCHAINE, C. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008, 72, 413–444.
14. SAMTLEBE, M., WAGNER, N., NEVE, H., HELLER, K.J., HINRICHS, J., ATAMER, Z. Reduction of *Lactococcus lactis* phage contamination in whey by means of membrane filtration: impact of phage morphology and of bacterial host cells functioning as “phage fishing tool”. *Int Dairy J*, 2017, 68, 88–94.
15. BAUGHER, J. L., DURMAZ, E., KLAENHAMMER, T.R. Spontaneously induced prophages in *Lactobacillus gasseri* contribute to horizontal gene transfer. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80, 3508–3517.
16. MERCANTI, D.J., CARMINATI, D., REINHEIMER, J.A., QUIBERONI, A. Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *Int J Food Microbiol*, 2011, 144, 503–510.
17. DURMAZ, E., MILLER, M.J., AZCARATE-PERIL, M.A., TOON, S.P., KLAENHAMMER, T.R. Genome sequence and characteristics of Lrm1, a prophage from industrial *Lactobacillus rhamnosus* strain M1. *Appl Environ Microbiol*. 2008, 74(15), 4601-9.
18. VERREAULT, D., GENDRON, L., ROUSSEAU, G.M., VEILLETTE, M., MASSE, D., LINDSLEY, W.G., MOINEAU, S., DUCHAINE, C. Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77, 491-497.
19. PUJATO, S. A., GUGLIELMOTTI, D. M., MARTINEZ-GARCIA, M., QUIBERONI, A., MOJICA, F. J. M. *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* bacteriophages: genomics and cross-species host ranges. *Int J Food Microbiol*, 2017, 257, 128–137.
20. LABRIE, S., MOINEAU, S. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66, 987–994.
21. PUJATO, S.A., QUIBERONI, A., MERCANTI, D.J. Bacteriophages on dairy foods. *Journal of Applied Microbiology*, 126, 14-30.
22. MICHELSEN, O., CUESTA-DOMINGUEZ, A., ALBRECHTSEN, B., JENSEN, P.R. Detection of bacteriophage-infected cells of *Lactococcus lactis* by using flow cytometry. *Appl Environ Microbiol*. 2007, 73(23), 75-81.
23. GARCÍA-ALJARO, C., MUÑOZ-BERBEL, X., MUÑOZ, F.J. On-chip impedimetric detection of bacteriophages in dairy samples. *Biosens Bioelectron*. 200, 24(6), 1712-6.
24. JOHLER, S., LAYER, F., STEPHAN, R. Comparison of virulence and antibiotic resistance genes of food poisoning outbreak isolates of *Staphylococcus aureus* with isolates obtained

- from bovine mastitis milk and pig carcasses. *Journal of Food Protection*, 2011, 74, 1852-1859.
25. OBESO, J.M., MARTÍNEZ, B., RODRÍGUEZ, A., GARCÍA, P. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage ΦH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 128, 212-218.
 26. LEITE, J.A., PEREIRA, H.P., BORGES, C.A.V., ALVES, B.R.C., RAMOS, A.I.A.P., MARTINS, M.F., ARCURI, E.F. Lytic bacteriophages as a potential alternative to control *Staphylococcus aureus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2019.
 27. NOVACEK, J., SIBOROVA, M., BENESIK, M., PANTUCEK, R., DOSKAR, J., PLEVKA, P. Structure and genome release of Twort-like Myoviridae phage with a double-layered baseplate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113, 9351–9356.
 28. GUGLIELMOTTI, D.M., MERCANTI, D.J., REINHEIMER, J.A., QUIBERONI, A. Efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Front. Microbiol*, 2012, 2, 282.
 29. SUÁREZ, V.B., REINHEIMER, J.A. Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian *Lactococcus lactis* phages. *J. Food Prot*, 2002, 65, 1756–1759.
 30. MARIÁNGELES, BRIGGILER, M., VIVIANA, B. S., ANDREA, Q., SILVINA, A. P. Inactivation of dairy bacteriophages by thermal and chemical treatments, Instituto de Lactología Industrial Santiago del Estero.
 31. AFENELON, M., PGUINEE, T. Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat contents. *International Dairy Journal*, 2000, 10, Issue 3, 151-158.
 32. STONE, T. W. Subtypes of NMDA receptors. *Gen. Pharmacol*, 1993, 24, 825–832.
 33. GUNASEKARAN, S. AK, M.M. Cheese rheology and texture. 1st ed. New York: CRC Press. 2003.
 34. Hotărâre de Guvern Nr. 158 din 07.03.2019 cu privire la aprobarea Cerințelor de calitate pentru lapte și produsele lactate.
 35. FOX, P. F., GUINNE, T. P., COGAN, M., MCSWEENEY, P. L. H. Microbiology of cheese ripening. *Fundamentals of Cheese Science*, 2000, 206–235.
 36. GARCIA-ALJARO, C., MUNOZ-BERBEL, X., JENKINS, A.T., BLANCH, A.R., MUNOZ, F.X. Surface plasmon resonance assay for real-time monitoring of somatic coliphages in wastewaters. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74, 4054-4058.

37. EBRECHT, A.C., GUGLIELMOTTI, D.M., TREMMEL, G., REINHEIMER, J.A., SUAREZ, V.B. Temperate and virulent *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages: comparison of their thermal and chemical resistance. *Food Microbiol*, 2010, 27, 515-520.
38. ATAMER, Z., DIETRICH, J., NEVE, H., HELLER, K.J., HINRICHS, J. Influence of the suspension media on the thermal treatment of mesophilic lactococcal bacteriophages. *Int Dairy J*, 2010, 20, 408-414.
39. QUIBERONI, A., GUGLIELMOTTI, D.M., REINHEIMER, J.A. Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. *Int J Food Microbiol*, 2003, 84, 51-62.
40. MÜLLER-MERBACH, M., RAUSCHER, T., HINRICHS, J. Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. *Int Dairy J*, 2005, 15, 777-784.
41. BARRANGOU, R., FREMAUX, C., DEVEAU, H., RICHARDS, M., BOYAVAL, P., MOINEAU, S., ROMERO, D.A., HORVATH, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315, 1709-1712.
42. HALE, C.R., ZHAO, P., OLSON, S., DUFF, M.O., GRAVELEY, B.R., WELLS, L., TERNS, R.M., TERNS, M.P. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, 2009, 139, 945-956.
43. FINERAN, P.C., BLOWER, T.R., FOULDS, I.J., HUMPHREYS, D.P., LILLEY, K.S., SALMOND, G.P.C. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106, 894-899.
44. CHAPOT-CHARTIER, M.P., VINOGRADOV, E., SADOVSKAYA, I., ANDRE, G., MISTOU, M.Y., TRIEU-CUOT, P., FURLAN, S., BIDNENKO, E., COURTIN, P., PECHOUX, C. Surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle. *J Biol Chem*, 2010, 285, 10464-10471.
45. MAYNARD, N.D., BIRCH, E.W., SANGHVI, J.C., CHEN, L., GUTSCHOW, M.V., COVERT, M.W. A forward-genetic screen and dynamic analysis of lambda phage host-dependencies reveals an extensive interaction network and a new anti-viral strategy. *PLoS Genet*. 2010, 6, 1001-1017.
46. GUZUN V., MUSTAȚA G., RUBȚOV S., VIZIREANU C., BANU C., Industrializarea laptelui. Editura Tehnica-Info, 2001.