

УДК 578.81/637.33

БЕЗПЕЧНІСТЬ І ЯКІСТЬ СИРУ: ФАГИ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ*Шугай М. О., к.б.н, с.н.с.*<https://orcid.org/0000-0003-1844-5967>

Інститут продовольчих ресурсів НААН, м. Київ, Україна

<https://doi.org/10.31073/foodresources2024-23-25>

Предмет. Промислове виробництво молочних ферментованих продуктів неминуче стикається з проблемами порушень ферментації, спричиненими бактеріальними вірусами – бактеріофагами (або фагами), активними до заквашувальних культур. Найбільшою шкоди фаги завдають сироварінню, що пов'язано з особливостями отримання сиру і біології цих вірусів. У статті проведено аналіз сучасної літератури, присвяченої проблемі запобігання порушень ферментації під час виробництва сиру. Предметом досліджень були сучасні дані щодо особливостей біології фагів молочнокислих бактерій (МКБ) та їх співіснування з бактеріями-хазяями; інформація щодо джерел фагового забруднення виробництва, впливу технологічних операцій під час виробки сиру на репродукцію і накопичення фагів, методів їх виявлення та розробки нових підходів фагового контролю на виробництві. **Мета.** Аналітичний огляд сучасної наукової інформації щодо особливостей біології фагів МКБ та їх співіснування з бактеріями-хазяями, а також підходів фагового контролю на виробництві. **Методи.** Використали аналітичний метод, аналізували інформацію з баз даних: PubMed, Scopus, Web of Sciences, скористались результатами власних досліджень. **Результати.** Основним джерелом надходження фагів на виробництво є сире молоко, в якому вони можуть перебувати у вигляді віріонів або профагів у геномах бактерій-хазяїв. Через наявність та велику різноманітність фагів у природних екосистемах сирого молока, запобігти їх потраплянню та забезпечити відсутність фагів на виробництві практично неможливо. Оскільки наявність фагів у середовищі молочних заводів є неминучою, зусилля дослідників спрямовані на розробку ефективних механізмів фагового контролю, а не на повну елімінацію вірусів. Сучасні методи фагового контролю на виробництві включають: використання заквасок прямого внесення, що містять фагостійкі фагонеспоріднені штами МКБ, запровадження ротаційних схем заквашувальних препаратів, проведення фагового моніторингу, запобігання утворенню аерозолів та кондиціонування повітря, ретельне очищення місць отримання сироватки та резервуарів для її зберігання, дотримання вимог санітарії і гігієни, використання дезінфектантів з антифаговою дією. Наявність різноманітних джерел фагового забруднення у поєднанні з високою генетичною гнучкістю фагів робить ці віруси перманентною проблемою виробництва молочних ферментованих продуктів, яка вимагає постійного моніторингу та проведення досліджень для розробки нових підходів до фагового контролю, а також розробки нових технологій вилучення фагів із сировини, побічних продуктів виробництва, повітря й обладнання. **Сфера застосування результатів.** Сироробні та молокопереробні підприємства.

Ключові слова: бактеріофаги, молочнокислі бактерії, сироваріння, фаголізис, ферментація

CHEESE SAFETY AND QUALITY: PHAGES OF LACTIC ACID BACTERIA*Myroslava Shugai, PhD, Biology, Sen. Researcher*<https://orcid.org/0000-0003-1844-5967>

Institute of Food Resources of NAAS, Kyiv, Ukraine

Subject. The industrial production of dairy fermented products inevitably faces the problems of fermentation disorders caused by bacterial viruses - bacteriophages (or phages) active on fermenting cultures. Phages cause the greatest damage to cheesemaking, which is related to the peculiarities of cheese production and the biology of these viruses. The article analyzes modern literature devoted to the problem of prevention of fermentation disorders during cheese production. The subject of the research was modern data on the peculiarities of the biology of phages of lactic acid bacteria (LAB) and their coexistence with host bacteria; information on the sources of phage contamination of production, the influence of technological operations during cheese production on the reproduction and accumulation of phages, methods of their detection and the development of new approaches to phage control in

production. **Purpose.** Analytical review of current scientific information on the biology of MCD phages and their coexistence with host bacteria, as well as approaches to phage control in production. **Methods.** We used an analytical method, analyzed information from databases: PubMed, Scopus, Web of Sciences, and used the results of our own research. **Results.** The main source of phages for production is raw milk, in which they can be in the form of virions or prophages in the genomes of host bacteria. Due to the presence and great diversity of phages in the natural ecosystems of raw milk, it is almost impossible to prevent their entry and ensure the absence of phages in production. Since the presence of phages in the environment of dairy plants is inevitable, the efforts of researchers are directed to the development of effective phage control mechanisms, rather than to the complete elimination of viruses. Modern methods of phage control in production include: the use of direct application starters containing phage-resistant phage-unmatched strains of the LAB, the introduction of rotation schemes of leavening preparations, conducting phage monitoring, prevention of aerosol formation and air conditioning, thorough cleaning of places where serum is obtained and tanks for its storage, compliance with requirements sanitation and hygiene, use of disinfectants with antiphage action. The presence of various sources of phage contamination combined with the high genetic flexibility of phages makes these viruses a permanent problem in the production of fermented dairy products, which requires constant monitoring and research to develop new approaches to phage control, as well as the development of new technologies for extracting phages from raw materials, production by-products, air, and equipment. **Scope of research result.** Cheese and dairy factories.

Key words: bacteriophages, lactic acid bacteria, cheese making, phagolysis, fermentation

Постановка проблеми. Відколи сироваріння стало потужною складовою молокопереробної галузі, виробники стикнулися з проблемами порушень ферментації, причину яких тривалий час встановити не вдавалось. Загадковим було те, що в молоці, отриманому від здорових корів, закваска з високоактивних культур МКБ, яка використовувалась щодня протягом тижнів і навіть місяців, несподівано знижувала чи припиняла кислотоутворення. Лише 1935 року Whitehead and Cox з Новозеландського Інституту молока з'ясували, що причиною порушення ферментації молока є вірулентні фаги, які здатні спричиняти лізис штамів закваски [1]. З того часу бактеріофаги залишаються серйозною проблемою виробництва молочних ферментованих продуктів, особливо сиру [2, 3, 4]. Причини такої ситуації слід шукати в особливостях виробництва та біологічних властивостях бактеріофагів.

Мета роботи – аналітичний огляд сучасної наукової інформації щодо особливостей біології фагів МКБ та їх співіснування з бактеріями-хазяями, а також підходів фагового контролю на виробництві.

Методи дослідження. Під час роботи здійснювали пошук, систематизацію та узагальнення наукової інформації, використали аналітичний метод. Аналізували інформацію з доступних баз даних: PubMed, Scopus, Web of Sciences, скористались результатами власних досліджень. Предмет досліджень – сучасні дані щодо особливостей біології фагів МКБ та їх співіснування з бактеріями-хазяями; інформація щодо джерел фагового забруднення виробництва, впливу технологічних операцій під час виробки сиру на репродукцію і накопичення фагів, методів їх виявлення та підходів фагового контролю на виробництві.

Результати та їх обговорення. Відомо, що визрівання сичужних сирів – процес біологічний і обумовлений життєдіяльністю мікрофлори закваски. Динаміка та кінцевий результат ферментації залежать від багатьох факторів, у тому числі від якості молока-сировини, біологічних особливостей культур закваски, режимів технологічного процесу та фізико-хімічних умов під час виробки, соління і визрівання сиру.

Фаги всюдисущі, вони відрізняються геномами та структурою віріонів і завжди наявні там, де є бактерії-хазяї. Як і всі віруси фаги не здатні до самостійної репродукції і розмножуються лише в живих клітинах чутливих хазяїв, використовуючи їх біосинтетичний апарат. За оцінками науковців чисельність фагів у біосфері на порядок перевищує чисельність бактерій і становить приблизно 10^{31} фагових часток [5].

Вважається, що в природі бактеріофаги формують таксономічний і функціональний склад мікробних спільнот, а також їх чисельність і стабільність [6].

За умов нестерильного виробництва фаги неминуче потрапляють у заводське середовище через сире молоко чи інші інгредієнти і зазвичай наявні у повітрі чи на молочному обладнанні [3, 4]. Основним і перманентним джерелом надходження фагів на виробництво є сире молоко. У молоці наявні різноманітні бактерії, у тому числі МКБ та їх фаги, що можуть перебувати у вигляді віріонів або профагів у геномах бактерій-хазяїв. За даними дослідників концентрація фагових часток у сирому молоці коливається в межах ($10^1 \div 10^4$) БУО/см³. Відомо також, що лактофаги мають високу термостійкість і здатні вижити за режимів пастеризації молока, прийнятих для виробництва сиру і кисломолочних продуктів [7, 8, 9]. Таким чином, фаги легко потрапляють на виробництво і якщо для ферментації використовують чутливі до них штами лактобактерій, фаги швидко накопичуються, досягаючи критично високого титру – до 10^9 вірусних часток у см³ підсирної сироватки [9]. Отже, через наявність та велику різноманітність фагів у природних екосистемах сирого молока, запобігти їх потраплянню та забезпечити відсутність фагів на виробництві практично неможливо.

Хоча основним джерелом фагового забруднення виробництва є сире молоко, дослідники звертають увагу на важливість заходів щодо запобігання розповсюдження вірусної інфекції у промисловому середовищі. Поширення фагових часток може відбуватись у вигляді аерозолі внаслідок розбризкування сироватки, переміщення персоналу або транспортування обладнання, особливо якщо воно здійснюється між забрудненою і незабрудненою зонами. Такі біоаерозолі можуть триматись у повітрі упродовж тривалого часу [6]. Зокрема, під час виробки сиру у повітрі різних зон заводу були виявлені фаги титру від 10^2 БУО/м³ до 10^8 БУО/м³ [10].

Додатковими і часто недооцінюваними джерелами фагового забруднення є робочі поверхні приміщень виробництва: підлога, стіни, обладнання, сходи, дверні ручки, офісні столи. Джерелом вірусної інфекції можуть бути додаткові інгредієнти, зокрема, концентрати сироваткових білків, які вносять з метою збільшення виходу цільового продукту, поліпшення його органолептичних показників та біологічної цінності. Річ у тім, що сироватка, з якої готують білкові концентрати, містить фаги, а компоненти сироватки такі як солі, білки, жир та сахариди сприяють термостійкості фагів, захищаючи їх від термічного пошкодження [11]. Для мінімізації проблем рекомендовано додавати підсирну сироватку лише у випадку якщо для ферментації використовують суттєво інші закваски ніж ті, за допомогою яких було отримано сироватку.

Також важливо відмітити, що сироваткові продукти, отримані з використанням природних заквасок (невідомого видового складу), не варто залучати до виробництва продуктів, ферментування яких відбувається визначеними культурами (відомого складу), оскільки природні закваски часто містять фаги, що становлять серйозну небезпеку для обмеженої кількості штамів визначених заквасок [12].

Не слід виключати ймовірність потраплення бактеріофагів на виробництво через закваски, де вони можуть перебувати у вірулентній формі – прикріпленими до оболонки бактеріальних клітин, або у стані хронічної інфекції – у вигляді профагів, інтегрованих в геном бактерії-хазяїна [13]. Геноми лактобактерій, можуть містити один чи декілька профагів [14, 15]. Тип взаємодії бактерії з фагом, за якого фаг перебуває в геномі бактерії у стані профага (фагової ДНК) отримав назву лізогенія. Лізогенія дуже поширена серед лактококів та лактобацил і з меншою частотою зустрічається серед штамів *Streptococcus thermophilus*. У лізогенній клітині геном профага реплікується *in situ* разом з геномом бактерії-хазяїна. Однак за певних умов, залежно від стану живлення інфікованої клітини та множинності вірусної інфекції, профаги можуть переходити у вірулентний стан (рис.1).

Індукція профага з бактеріальної хромосоми та його перехід його до літичного життєвого циклу часто відбувається за умов стресу для бактеріальної клітини,

спричиненого зміною температури чи концентрації солей, бактеріоцинами, ультрафіолетовим випромінюванням, голодуванням, або спонтанно з частотою до 9% [16, 17].

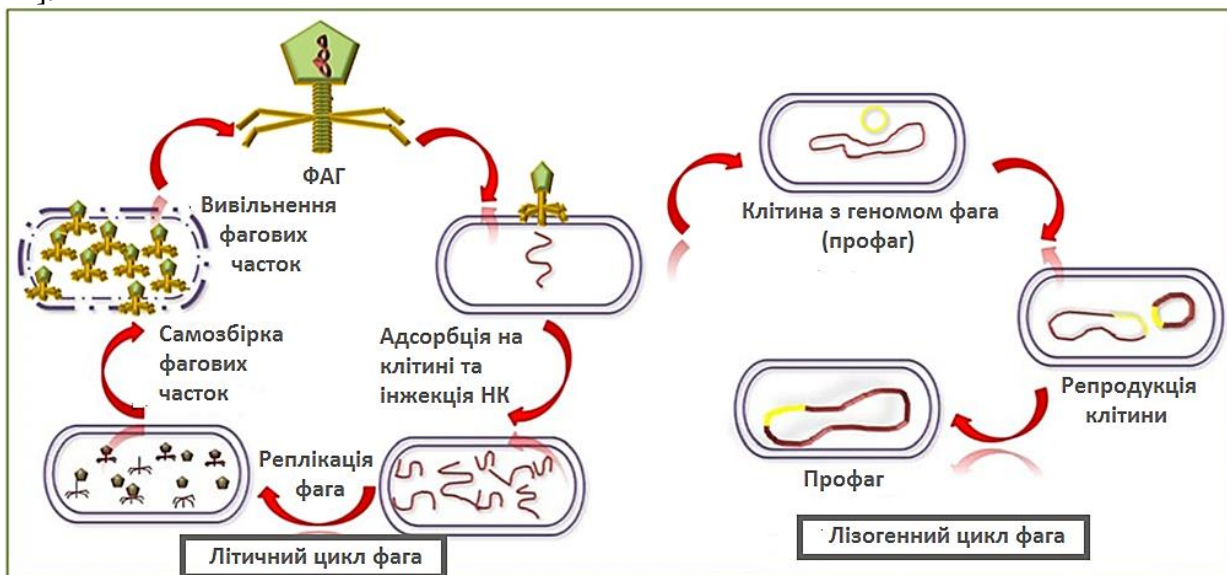


Рис. 1. Життєвий цикл фагів (НК – нуклеїнова кислота)

У вірулентному стані віруси здатні інфікувати та лізувати чутливі штами закваски, призводячи до сповільнення наростання кислотності, а в критичних випадках до збою ферментації і втрати цільового продукту. Лізис певних штамів закваски може стати причиною отримання низькоякісних або неякісних продуктів з різноманітними органолептичними вадами, такими як погіршення смаку й аромату, нетипова консистенція, відсутність отворів у голландських і швейцарських сирах та ін. [6, 15, 18]. Залежно від стадії процесу, на якій відбувається масовий фаголізис заквашувальних культур, наслідки порушення ферментації можуть варіюватися від повільного утворення кислоти до повної втрати виробленої партії продукту. Результатом фагових атак на ранніх етапах ферментації є високе значення активної кислотності через недостатній вміст молочної кислоти та велика залишкова концентрація лактози. Лактоза може стати субстратом для метаболічної активності сторонньої мікрофлори, що негативно позначиться на якості продукту. Крім цього перелічені фактори можуть створити оптимальну екосистему для росту патогенних мікроорганізмів, а це загрожує серйозними наслідками для здоров'я споживача. Проблема створює і той факт, що перебуваючи у довкіллі фаги дуже стійкі і, не зважаючи на застосування заходів виробничої гігієни та використання дезінфектантів, можуть зберігатись у середовищі виробництва упродовж кількох років [19, 20].

У багатьох країнах у крафтовому виробництві традиційних сирів використовують природні закваски, що складаються з мікроорганізмів невизначеного видового складу. Такі кустарні закваски вважаються високо толерантними до фагової інфекції, оскільки наявні в них лактобактерії репродукуються за наявності фагів, що призводить до домінування резистентних або толерантних штамів [21]. Однак через низьку відтворюваність технологічних характеристик у промисловому великомасштабному виробництві сиру їх замінено на багатоштамові закваски прямого внесення (DSC та DVI). Штами, що входять до складу таких заквасок добре досліджені, технологічні показники високо відтворювані, але внаслідок обмеженої кількості наявних у них штамів, вони є чутливими до фагової інфекції.

Для зменшення ризику фагового забруднення використовують концентровані заквашувальні препарати (10^{10} – 10^{12} КУО/г), які вносять безпосередньо в чан (пряма інокуляція культур DVI), без необхідності активації закваски, тим самим запобігаючи

інфікуванню фагами з середовища сироварні. Використання та ротація DVI заквасок є важливою складовою ефективною програми фагового контролю, оскільки допомагає уникнути повторного інфікування тим самим фагом і запобігає накопиченню вірусів на виробництві. Таким чином, різноманітність можливих джерел фагової інфекції у поєднанні з високою генетичною гнучкістю фагів робить ці віруси перманентною проблемою виробництва молочних ферментованих продуктів, яка вимагає постійного моніторингу та проведення досліджень для розробки нових підходів, спрямованих на запобігання виникненню ситуацій масового фаголізу (рис. 2).

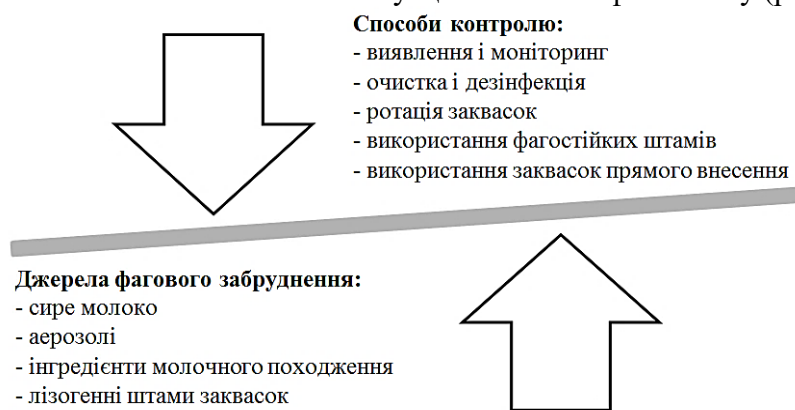


Рис. 2. Фактори забруднення виробництва фагами та способи їх контролю

Процес молочнокислого бродіння за наявності фага може відбуватися порізно. У разі інфікування заквашувальних культур гомологічними вірулентними фагами низького титру суттєвих відхилень технологічного процесу не спостерігається, що дозволяє отримати продукт задовільної якості. Однак завдяки високій репродуктивній здатності та відносно короткому латентному періоду – від

20 хв [15, 22], титр бактеріофагів може швидко зрости, призводячи до уповільнення ферментації і навіть до втрати продукту. Пояснюється це тим, що в процесі сироваріння ряд технологічних операцій сприяють розмноженню та накопиченню фагів: внесення в молоко хлористого кальцію (двовалентні іони, особливо кальцію, стимулюють репродукцію багатьох фагів МКБ); тривале перемішування під час обсушки сирного зерна, внаслідок чого зростає контакт бактерій та фагів; малі дози внесеної закваски та ін. Тому на сироробних заводах фаги виявляються частіше в приміщеннях, безпосередньо пов'язаних з виробництвом сиру. Крім того внесення фага, активного до одного із штамів закваски, зазвичай суттєво не впливає на швидкість наростання активної кислотності сирної маси та загальну чисельність мікрофлори, оскільки життєдіяльність інших штамів закваски забезпечує нормальний хід молочнокислої ферментації та накопичення біомаси лактобактерій. За умов внесення фагів-гомолігів до двох чи трьох штамів закваски спостерігається різке падіння швидкості кислотоутворення під час пресування, внаслідок зменшення загальної чисельності лактобактерій порівняно з контролем, що призводить до зниження темпів протеолізу, що дуже негативно позначається на якості отриманого сиру [23].

Значні зусилля дослідників спрямовані на розробку методів виявлення фагів та запобігання розвитку ситуацій масового фаголізу на виробництві. Одним із найпоширеніших способів виявлення фагів на молочних заводах є тест на активність, що ґрунтується на визначенні швидкості наростання кислотності під час ферментування молока. Цей тест свідчить про присутність фагів у разі коли наростання активної кислотності уповільнюється [21]. Проведення фагового моніторингу включає мікробіологічні та молекулярні методи аналізу. Загальновизнаним мікробіологічним методом є метод подвійного агару, який дозволяє встановити рівень фагового забруднення. Однак для мікробіологічних досліджень необхідні індикаторні штами, крім того такі дослідження займають багато часу, тому було розроблено ряд альтернативних молекулярних методів, спрямованих на виявлення присутності фагових віріонів або їх компонентів – білків чи ДНК. Імунологічні методи, наприклад, імуоферментний аналіз, ґрунтуються на використанні специфічних до структурних білків віріона антитіл, тоді як

вірусну ДНК можна виявити за допомогою специфічних ДНК-гібридаційних зондів або за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Методи ПЛР були успішно адаптовані для виявлення та ідентифікації фагів на різних етапах виробництва молочних продуктів. В одній мультиплексній ПЛР (англ. multiplex PCR) реакції можна виявити кілька найпоширеніших фагів, що інфікують молочнокислі бактерії, зокрема, фаги *Lactococcus lactis* P335, 936 і c2 та фаги *Streptococcus thermophilus* і *Lactobacillus delbrueckii* [3, 24].

Упровадження молекулярних технологій і подальше застосування геноміки виявились дуже успішними для з'ясування таксономічного положення фагів, пояснення їх надзвичайно високої адаптивності, а також допомогли краще зрозуміти природу інфекційного процесу та з'ясувати арсенал механізмів фагостійкості, яких набули в процесі еволюції потенційно чутливі бактерії для боротьби з інфекцією.

На основі морфології віріонів (рис. 3, рис.4) та спорідненості ДНК фаги, активні до промислових штамів лактобактерій (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) дослідники поділяються на десять [25], шість [26] чи п'ять груп [27, 28]. Декілька з цих груп було ідентифіковано упродовж останнього десятиліття, що свідчить про високу адаптивність вірусів у середовищі виробництва та значну поширеність проблеми бактеріофагії.

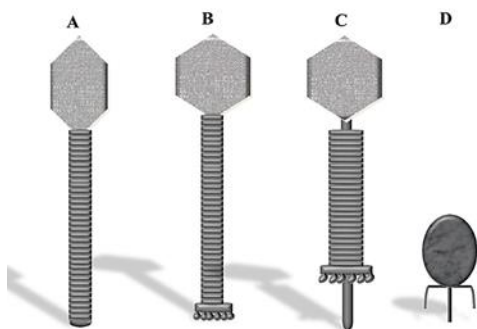


Рис. 3. Схематичне зображення морфотипів фагів, що інфікують МКБ:

А – фаги родини *Siphoviridae* з витягнутою головкою, В – фаги родини *Siphoviridae* з ізометричною головкою. Представники родини *Siphoviridae* мають довгі нескоротливі хвостові відростки. С – фаги родини *Myoviridae* з довгим скоротливим хвостовим відростком, D – фаги родини *Podoviridae* з коротким нескоротливим хвостовим відростком [29].

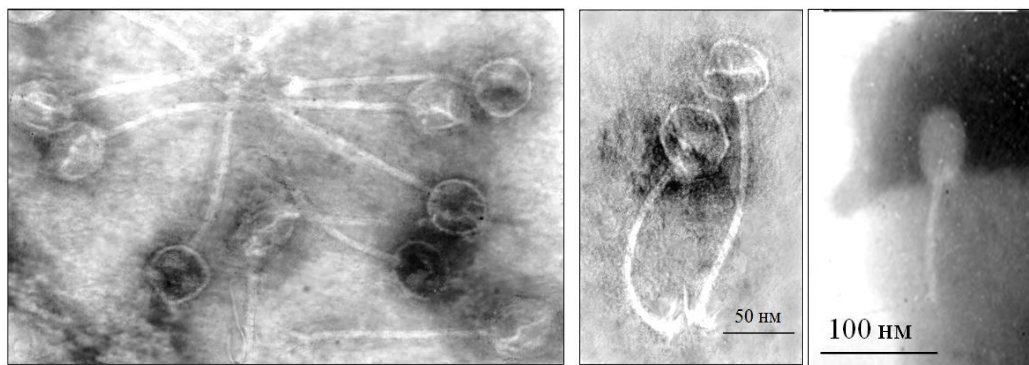


Рис. 4. Електроннограма фагів, вилучених з підсирної сироватки (інструментальне збільшення 40 000), фото автора

Взаємодія фагів з чутливими до них лактококами і термофільними стрептококами була в центрі уваги дослідників упродовж останніх чотирьох десятиліть. Результатом стало розуміння стратегій, які використовують фаги для інфікування вказаних видів бактерій та стратегій, які використовують бактерії для захисту від фагової інфекції. Найважливішими напрямками досліджень стали:

- характеристика систем фагостійкості бактерій

- дослідження рецепторів клітинної стінки бактерії-хазяїна і їх кореляція з відповідними фаговими білками, що забезпечують адсорбцію вірусу на чутливій клітині. Результати досліджень дозволили розробити підходи до створення фагостійких заквашувальних культур, а також спрогнозувати чутливість лактобактерій до фагів,

ідентифікувати генетично споріднені чи неспоріднені штами з метою їх використання у ротаційних схемах [2].

Тривале співжиття лактобактерій та їх фагів в одному середовищі сприяло набуттю бактеріями різноманітних фагозахисних механізмів, які можуть кодуватись плазмідними або хромосомними генами: інгібування адсорбції фагів, блокування інжекції ДНК, системи рестрикції/модифікації, системи CRISPR-Cas та абортівні інфекції. Перенесення різноманітних фагорезистентних механізмів до промислових штамів МКБ дало змогу істотно підвищити їх фагостійкість. Однак інтенсивне використання таких фагостійких культур з часом призводить до виникнення активних до них фагових мутантів.

Можливість конструювання фагостійких штамів відкрила перспективи для використання ротаційних стратегій, що базуються на особливостях різних фагозахисних механізмів. Sing and Klaenhammer [30], зокрема, започаткували новий підхід для ротації заквасок, суть якого полягає у використанні дериватів одного штаму, які містять різні фагозахисні механізми. Це дозволило обмежити виникнення фагів, що так чи інакше з'являються за умов безперервного використання будь-якої культури. Уведення різноманітних резистентних механізмів, які діють на різних етапах фагового літичного циклу, допомагає оптимізувати фагове інгібування, а отже, мінімізує появу і накопичення нових літичних бактеріофагів у межах заводу.

Завдяки використанню ротації фагозахисних стратегій високопродуктивні штами до певної міри можуть бути захищені за умов їх безперервного використання у виробництві, що дозволяє розширити використання культур, які мають хороші ферментативні показники. До того ж спрощується процедура проведення заводського моніторингу за виникненням нових фагів, оскільки для скринінгу зразків як індикаторний може бути використаний початковий (материнський) штам, що, очевидно, є найчутливішим до фагової інфекції, тоді як за умов використання традиційних ротацій для проведення моніторингу заводських фагових популяцій зазвичай щодня використовується від 20 до 50 різноманітних індикаторних штамів [30]. Отже, ротація фагорезистентних механізмів в одному хазяїні – значне досягнення щодо вдосконалення заквашувальних культур.

Альтернативою може слугувати отримання із чутливих штамів спонтанних фагостійких мутантів. Цей спосіб простий, не передбачає генетичних маніпуляцій і тому не має нормативних обмежень щодо застосування в промисловому середовищі, однак має суттєвий недолік – високу частоту реверсії бактерій до чутливого фенотипу [31, 32].

Висновки.

1. Через високий вміст і велику різноманітність фагів у природних екосистемах сирого молока, запобігти потраплянню фагів та забезпечити їх відсутність на виробництві практично неможливо, тому зусилля дослідників спрямовані на розробку ефективних механізмів фагового контролю, а не на повну елімінацію вірусів.

2. Наявність різноманітних джерел фагового забруднення у поєднанні з високою генетичною гнучкістю фагів робить ці віруси перманентною проблемою виробництва молочних ферментованих продуктів, яка вимагає постійного моніторингу та проведення досліджень для розробки нових підходів до фагового контролю, а також розробки нових технологій вилучення фагів із сировини, побічних продуктів виробництва, повітря й обладнання.

Бібліографія

1. Whitehead H. R., Cox G. The occurrence of bacteriophage in starter cultures of lactic streptococci. N. Z. J. Dairy Sciences. Technol. 1935. 16, 319–320.
2. Charneco G.O., de Waal P.P., van Rijswijck I. M.H., van Peij N., van Sinderen D., Mahony J. Bacteriophages in the Dairy Industry: A Problem Solved? Annu Rev Food Sci Technol. 2023. 14(1), 367–385.

3. Rio del B., Binetti A.G., Martín M.C., Fernández 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.
4. Verreault D., Gendron L., Rousseau G.M., Veillette M., Massé D. Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. 77, 491–97.
5. Strathdee S. A., Hatfull G. F., Mutalik V. K., Schooley R. T. Review Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. *Cell* 2023. 186(1), 17–31.
6. Xumei S., Haibo J., Siyuan Z. Diversities and interactions of phages and bacteria in deep-sea sediments as revealed by metagenomics *Front. Microbiol. Sec. Virology* 2023. 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1337146>.
7. 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, 228–35.
8. Briggiler M. M., De Antoni G. L., Reinheimer J. A., Quiberoni A. Thermal, chemical, and photocatalytic inactivation of *Lactobacillus plantarum* bacteriophages. *J. Food. Prot.* 2009. 72, 1012–1019.
9. Atamer Z., Ali Y., Neve H., Heller K. J., Hinrichs J. Thermal resistance of bacteriophages attacking flavor-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. *Int. Dairy J.* 2011. 21, 327–334.
10. Neve H., Berger A., Heller K.J. A method for detecting and enumerating airborne virulent bacteriophage of dairy starter cultures. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 1995. 47, 193–207.
11. Geagea H., Gomaa A.I., Remondetto G., Moineau S., Subirade M. Investigation of the protective effect of whey proteins on lactococcal phages during heat treatment at various pH. *Int. J. Food Microbiol.* 2015. 210, 33–41.
12. Carminati D., Giraffa G., Quiberoni A., Binetti A., Suárez V., Reinheimer J. Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. In: Mozzi F., Raya R., Vignolo G. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. Iowa, USA: Wiley-Blackwell 2010, 177–192.
13. Somerville V., Berthoud H., Schmidt R.S., Bachmann H.-P., Meng Y.H. Functional strain redundancy and persistent phage infection in Swiss hard cheese starter cultures. *ISME J.* 2021. 16, 388–99.
14. Escobedo S., Wegmann U., de Pipaon M.P., Campelo A.B., Stentz R., Rodríguez A., Martínez B. Resident TP712 Prophage of *Lactococcus lactis* Strain MG1363 Provides Extra Holin Functions to the P335 Phage CAP for Effective Host Lysis. *Appl Environ Microbiol.* 2021. 87 (19). <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.01092-21>.
15. Oliveira J., Mahony J., Hanemaaijer L., Kouwen T.R., van Sinderen D. Biodiversity of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis* starter cultures. *J. Dairy Sci.* 2018. 101, 96–105.
16. Ho C.-H., Stanton-Cook M., Beatson S.A., Bansal N., Turner M.S. Stability of active prophages in industrial *Lactococcus lactis* strains in the presence of heat, acid, osmotic, oxidative and antibiotic stressors. *Inter. Journal of Food Microbiol.* 2016. 220, 26–32.
17. Alexeeva S., Martínez J.A., Spus M. Spontaneously induced prophages are abundant in a naturally evolved bacterial starter culture and deliver competitive advantage to the host. *BMC Microbiol.* 2018. 18, 120. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1229-1>.
18. Pujato S., Quiberoni A., Mercanti D. Bacteriophages on dairy foods. *J. Appl. Microbiol.* 2019. 126, 14–30.
19. Lavelle K., Murphy J., Fitzgerald B., Lugli G.A., Zomer A. A decade of *Streptococcus thermophilus* phage evolution in an Irish dairy plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. 84(10). <https://doi.org/10.1128/AEM.02855-17>.
20. Guglielmotti D. M., Mercanti D. J., Reinheimer J. A., Quiberoni A. Review: efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Front. Microbiol.* 2012. 2 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00282>.
21. Marcó M.B., Moineau S., Quiberoni A. Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* 2012. 2, 149–158.
22. Miklic A., Rogelj I. Characterization of lactococcal bacteriophages isolated from Slovenian dairies *Intern. J. of Food Sci. and Technol.* 2003. 38, 305–311.

23. Neve H., Berger A., Heller K. J. A method for detecting and enumerating airborne virulent bacteriophage of dairy starter cultures. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 1995. 47, 193–207.
24. Labrie S., Moineau S. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. 66, 987–994.
25. Deveau H., Labrie S. J., Chopin M. C., Moineau S. Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. 72, 4338–4346.
26. Ali Y., Kot W., Atamer Z., Hinrichs J., Vogensen F.K. Classification of lytic bacteriophages attacking dairy *Leuconostoc* starter strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. 79, 3628–3636.
27. Casey E., Mahony J., Neve H., Noben J.-P., Dal Bello F., van Sinderen D. Novel phage group infecting *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, as revealed by genomic and proteomic analysis of bacteriophage Ldl1. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. 81, 1319–1326.
28. Hanemaaijer L., Kelleher P., Neve H., Franz C., de Waal P. P. Biodiversity of phages infecting the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Microorganisms* 2021. 9(9), 1822. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091822>.
29. Mahony J., Bottacini F., van Sinderen D., Fitzgerald G.F. Progress in lactic acid bacterial phage research. *Microb Cell Fact* 13 (Suppl 1), (2014). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S1>.
30. Sing W. D., Klaenhammer T.R. A Strategy for Rotation of Different Bacteriophage Defenses in a Lactococcal Single-Strain Starter Culture Systems *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. 59(2), 365–372.
31. Binetti A. G., Bailo N. B., Reinheimer J. A. Spontaneous phage-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus*: Isolation and technological characteristics. *Int. Dairy J.* 2007. 17 (4), 343–349.
32. Capra M. L., Mercanti D. J., Rossetti L. C., Reinheimer J. A., Quiberoni A. Isolation and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophage-resistant mutants. *J. Appl. Microbiol.* 2011. 111, 371–381.

References

1. Whitehead, H. R., Cox G. (1935). The occurrence of bacteriophage in starter cultures of lactic streptococci N.Z. *J. Dairy Sciences. Technol.* 16. P. 319–320.
2. Charneco, G. O., de Waal, P. P., van Rijswijk, I. M. H., van Peij, N., van Sinderen, D., Mahony, J. (2023). Bacteriophages in the Dairy Industry: A Problem Solved? *Annu Rev Food Sci Technol.* 14 (1), 367–385.
3. Rio, del B., Binetti, A. G., Martín, M. C., Fernández, M., Magadán, A. H., Alvarez, M. A. (2007). Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol.* 24, 75–81.
4. Verreault, D., Gendron, L., Rousseau, G.M., Veillette, M., Massé, D. (2011). Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 491–97.
5. Strathdee, S. A., Hatfull, G. F., Mutalik, V. K., Schooley, R. T. (2023). Review Phage therapy: From biological mechanisms to future directions *Cell.* 186(1), 17–31.
6. Xumei, S., Haibo, J., Siyuan, Z. (2023). Diversities and interactions of phages and bacteria in deep-sea sediments as revealed by metagenomics *Front. Microbiol. Sec. Virology* Vol. 14 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1337146>.
7. Atamer, Z., Dietrich, J., Müller-Merbach, M., Neve, H., Heller, K. J., Hinrichs, J. (2009). Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *Int Dairy J.* 19, 228–35.
8. Briggiler, M. M., De Antoni, G. L., Reinheimer, J. A., Quiberoni, A. (2009). Thermal, chemical, and photocatalytic inactivation of *Lactobacillus plantarum* bacteriophages. *J. Food. Prot.* 72, 1012–1019.
9. Atamer, Z., Ali, Y., Neve, H., Heller, K. J., Hinrichs, J. (2011). Thermal resistance of bacteriophages attacking flavor-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. *Int. Dairy J.* 21, 327–334.
10. Neve, H., Berger, A., Heller, K.J. (1995). A method for detecting and enumerating airborne virulent bacteriophage of dairy starter cultures. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte.* 47, 193–207.
11. Geagea, H., Gomaa, A.I., Remondetto, G., Moineau, S., Subirade, M. (2015). Investigation of the protective effect of whey proteins on lactococcal phages during heat treatment at various pH. *Int. J. Food Microbiol.* 210, 33–41.

12. Carminati, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suárez, V., Reinheimer, J. (2010). Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. In: Mozzi F., Raya R., Vignolo G. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. Iowa, USA: Wiley-Blackwell. 177–192.
13. Somerville, V., Berthoud, H., Schmidt, R. S., Bachmann, H.-P., Meng, Y. H. (2021). Functional strain redundancy and persistent phage infection in Swiss hard cheese starter cultures. *ISME J.* 16, 388–99.
14. Escobedo, S., Wegmann, U., de Pipaon, M.P., Campelo, A.B., Stentz, R., Rodríguez, A., Martínez, B. (2021). Resident TP712 Prophage of *Lactococcus lactis* Strain MG1363 Provides Extra Holin Functions to the P335 Phage CAP for Effective Host Lysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 87 (19). <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.01092-21>.
15. Oliveira, J., Mahony, J., Hanemaaijer, L., Kouwen, T.R., van Sinderen, D. (2018). Biodiversity of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis* starter cultures. *J. Dairy Sci.* 101, 96–105.
16. Ho, C.-H., Stanton-Cook, M., Beatson, S.A., Bansal, N., Turner, M. S. (2016). Stability of active prophages in industrial *Lactococcus lactis* strains in the presence of heat, acid, osmotic, oxidative and antibiotic stressors. *Int. J. of Food Microbiol.* 220, 26–32.
17. Alexeeva, S., Martínez, J.A., Spus, M. (2018). Spontaneously induced prophages are abundant in a naturally evolved bacterial starter culture and deliver competitive advantage to the host. *BMC Microbiol.* 18, 120 <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1229-1>.
18. Pujato, S., Quiberoni, A., and Mercanti, D. (2019). Bacteriophages on dairy foods. *J. Appl. Microbiol.* 126, 14–30.
19. Lavelle, K., Murphy, J., Fitzgerald, B., Lugli, G.A., Zomer, A. (2018). A decade of *Streptococcus thermophilus* phage evolution in an Irish dairy plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 84 (10). <https://doi.org/10.1128/AEM.02855-17>.
20. Guglielmotti, D. M., Mercanti, D. J., Reinheimer, J. A., Quiberoni, A. (2012). Review: efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Front. Microbiol.* 2 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00282>.
21. Marcó, M. B., Moineau, S., Quiberoni, A. (2012). Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* 2, 149–158.
22. Miklic, A., Rogelj, I. (2003). Characterization of lactococcal bacteriophages isolated from Slovenian dairies. *Intern. J. of Food Sci. and Technol.* 38. P. 305–311.
23. Neve, H., Berger, A., Heller, K. J. (1995). A method for detecting and enumerating airborne virulent bacteriophage of dairy starter cultures. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte.* 47, 193–207.
24. Labrie, S., Moineau, S. (2000). Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 987–994.
25. Deveau, H., Labrie, S. J., Chopin, M. C., Moineau, S. (2006). Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4338–4346.
26. Ali, Y., Kot, W., Atamer, Z., Hinrichs, J., Vogensen, F. K. (2013). Classification of lytic bacteriophages attacking dairy *Leuconostoc* starter strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3628–36.
27. Casey, E., Mahony, J., Neve, H., Noben, J.-P., Dal Bello, F., van Sinderen, D. (2015). Novel phage group infecting *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, as revealed by genomic and proteomic analysis of bacteriophage Ldl1. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1319–26.
28. Hanemaaijer, L., Kelleher, P., Neve, H., Franz, C., de Waal, P.P. (2021). Biodiversity of phages infecting the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Microorganisms* 9 (9), 1822. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091822>.
29. Mahony, J., Bottacini, F., van Sinderen, D., Fitzgerald, G.F. (2014). Progress in lactic acid bacterial phage research. *Microb Cell Fact* 13 (Suppl 1), <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S1>.
30. Sing, W. D., Klaenhammer, T. R. (1993). A Strategy for Rotation of Different Bacteriophage Defenses in a Lactococcal Single-Strain Starter Culture Systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (2), 365–372.
31. Binetti, A. G., Bailo, N. B., Reinheimer, J. A. (2007). Spontaneous phage-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus*: Isolation and technological characteristics. *Int. Dairy J.* 17(4), 343–349.
32. Capra, M. L., Mercanti, D. J., Rossetti, L. C., Reinheimer, J. A., Quiberoni, A. (2011). Isolation and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophage-resistant mutants. *J. Appl. Microbiol.* 111, 371–381.