

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Max Rubner-Institut
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel

Thermische Inaktivierung von Bakteriophagen der mesophilen und thermophilen Milchsäurebakterien

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Dipl. oec. troph. Jochen Dietrich
aus Mainburg

Kiel, 2008

Dekan:	Prof. Dr. Uwe Latacz-Lohmann
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Knut J. Heller
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Karin Schwarz
Tag der mündlichen Prüfung:	24. Juli 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Abkürzungsverzeichnis

AiF	Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" e.V.
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
CsCl	Cäsiumchlorid
CSPD	Chemilumineszenz Substrat (Roche)
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HCl	Salzsäure
incl.	inklusive
kb	Kilobasenpaare
KMU	Kleine und mittlere Unternehmen
<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Ln.</i>	<i>Leuconostoc</i>
mod.	modifiziert
o/n	übernacht
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PbE	Plauebildende Einheiten
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RT	Raumtemperatur
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
spp.	Subspezies
SSC	Standard-Saline-Citrat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TMG	Tris-Magnesium-Gelatine
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
UV	ultraviolett
biovar.	Biovariante
w/v	Gewicht pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Bakteriophagen.....	1
1.1.1	Vermehrung der Phagen	1
1.1.2	Allgemeine Morphologie.....	2
1.1.3	Phagen der Milchsäurebakterien.....	3
1.2	Bakteriophagen in der Milchwirtschaft	7
1.3	Maßnahmen gegen Bakteriophagen.....	8
1.4	Inaktivierung von Bakteriophagen	9
1.4.1	Methoden zur Inaktivierung von Phagen.....	9
1.4.2	Thermische Inaktivierung	10
1.5	Ziel der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden	14
2.2	Nährmedien, Lösungen und Puffer	14
2.2.1	Nährmedien	14
2.2.2	Allgemeine Lösungen und Puffer	16
2.2.3	Lösungen zur DNA Präparation und Analyse	16
2.2.4	Lösungen zur Proteinanalyse.....	18
2.3	Verwendete Kulturen und Phagen.....	18
2.4	Bestimmung der Phagentiter durch Plaque- bzw. Spotttest.....	22
2.5	Isolierung der Phagen	22
2.6	Herstellung von Phagenlysaten.....	23
2.6.1	Anzucht in Bouillon	23
2.6.2	Abwaschen von Platten mit konfluenter Lyse	23
2.7	Anreicherung und Reinigung von Phagen mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	23
2.7.1	Anreicherung der Phagen	23
2.7.2	Aufreinigung der Phagen.....	24
2.8	DNA Extraktion und Analyse	24
2.8.1	Isolierung von Phagen DNA – Schnellmethode	24
2.8.2	Isolierung von Phagen DNA aus CsCl-Präparationen	25
2.8.3	Restriktionshydrolyse	25
2.8.4	Agarosegelelektrophorese	25
2.8.5	Untersuchung der Genomorganisation	26
2.8.5.1	Erhitzung der DNA.....	26
2.8.5.2	Ligation	26
2.8.6	DNA-DNA-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter Sonde	26
2.8.6.1	Herstellung der DIG-markierten DNA-Sonde	26
2.8.6.2	Effizienzermittlung der DIG-Markierung	27
2.8.6.3	Southern-Blot.....	27
2.8.6.4	DNA/DNA-Hybridisierung	27
2.8.6.5	Detektion.....	27

2.8.7	PCR	28
2.8.7.1	<i>L. lactis</i> Phagen	28
2.8.7.2	<i>S. thermophilus</i> Phagen	29
2.8.8	Pulsfeldgelelektrophorese	29
2.9	Phagenmonitoring	30
2.9.1	Probenaufbereitung	30
2.9.2	Kulturenaufbereitung	30
2.9.3	Säuerungsaktivitätstest	31
2.9.4	Bestimmung der Phagentiter in den Proben	31
2.10	Thermische Inaktivierung von Phagen.....	31
2.11	Stressfaktoren.....	32
2.11.1	Erhöhter Salzgehalt	32
2.11.2	Trockenheit.....	32
2.11.3	Hitze.....	32
2.12	Phagen mit unterschiedlicher spezifischer Dichte.....	33
2.13	Phagen Strukturprotein-Analyse	34
2.13.1	Präparation der Phagen-Strukturproteine	34
2.13.2	SDS-PAGE	34
2.14	Transmissions-Elektronenmikroskopie	34
2.14.1	Probenvorbereitung für die Transmissions-Elektronenmikroskopie.....	34
2.14.2	Elektronenmikroskopie	35
3	Ergebnisse.....	36
3.2	Phagenmonitoring	36
3.2.1	Phagennachweis in den Proben.....	36
3.2.2	Elektronenoptische Charakterisierung der Phagenisolate	39
3.2.3	Molekularbiologische Charakterisierung der Phagenisolate	44
3.2.3.1	<i>L. lactis</i> Phagen	44
3.2.3.2	Charakterisierung der hitzeresistenten <i>L. lactis</i> Phagen P1532 und P680.....	48
3.2.3.3	Bestimmung der Genomorganisation der hitzestabilen Phagen P1532 und P680 ..	51
3.2.3.4	Bestimmung der Genomgröße der hitzestabilen Phagen P1532 und P680	52
3.2.3.5	Vergleich der Strukturproteine der hitzeresistenten <i>L. lactis</i> Phagen	53
3.2.3.6	Bestimmung der Nachweisgrenze der PCR-Detektion	54
3.2.3.7	<i>S. thermophilus</i> Phagen	55
3.2.3.8	<i>Ln. mesenteroides</i> Phagen.....	57
3.3	Thermoresistenz der Phagen mesophiler und thermophiler Milchsäurebakterien	58
3.3.1	<i>L. lactis</i> Phagen	58
3.3.2	Hitzeresistenz der <i>L. lactis</i> 936 Phagen Isolate verschiedener Jahre aus einem Betrieb	63
3.3.3	Thermoresistenz des <i>L. lactis</i> Phagen TP901-1 im Vergleich zum Derivat TP901- BC1034 mit zusätzlicher 1,1-kb-Genominserktion	64
3.3.4	Thermische Inaktivierung des <i>L. lactis</i> Phagen P008 mit unterschiedlicher spezifischer Dichte	65
3.3.5	<i>S. thermophilus</i> Phagen	68
3.3.6	<i>Ln. mesenteroides</i> Phagen	71

3.3.7	<i>Lb. delbrueckii</i> Phagen	72
3.4	Einfluss von äußeren Stressfaktoren auf die Hitzestabilität von Phagen.....	74
3.4.1	Erhöhter Salzgehalt	74
3.4.2	Trockenheit	76
3.4.3	Hitze.....	79
3.5	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Phageninaktivierung in unterschiedlichen Suspensionsmedien.....	82
4	Diskussion.....	91
4.2	Phagenmonitoring	91
4.2.1	Probenerhebung.....	91
4.2.2	Phagennachweis	92
4.2.3	Phagencharakterisierung	92
4.3	Thermische Inaktivierung von Phagen.....	94
4.3.1	<i>L. lactis</i> Phagen	95
4.3.2	<i>S. thermophilus</i> Phagen	96
4.3.3	<i>Ln. mesenteroides</i> Phagen	96
4.3.4	<i>Lb. delbrueckii</i> Phagen.....	97
4.4	Hitzeresistenz von Phagen.....	97
4.4.1	Vergleich der thermoresistenten <i>L. lactis</i> Phagen.....	97
4.5	Einfluss von Stressfaktoren auf die Hitzestabilität von Phagen	102
4.5.1	Erhöhter Salzgehalt	102
4.5.2	Trockenheit.....	103
4.5.3	Hitze.....	104
4.6	Mechanismen der Hitzeinaktivierung von Phagen	105
4.7	Resümee.....	106
5	Zusammenfassung	107
6	Summary	108
7	Anhang	109
8	Literaturverzeichnis.....	114

1 Einleitung

1.1 Bakteriophagen

Bakteriophagen (kurz Phagen) sind Viren, die Bakterien befallen können. Sie wurden von Twort, 1915 und d'Herelle, 1917 unabhängig voneinander entdeckt. Phagen können sich nur mit Hilfe einer Wirtszelle weiter vermehren, da sie keinen eigenen Stoffwechsel besitzen. Sie existieren zusammen mit ihren Wirten in jedem denkbaren Habitat und werden mengenmäßig zu den häufigsten biologischen Einheiten gezählt (Wommack & Colwell, 2000).

1.1.1 Vermehrung der Phagen

Man unterscheidet drei Vermehrungszyklen, die Phagen zur Reproduktion nutzen können: Den lytischen und lysogenen Zyklus und den Vermehrungszyklus von filamentösen Phagen. Auf letzteren wird nicht näher eingegangen, da dieser bei den hier beschriebenen Phagen-Wirt-Systemen nicht vorkommt.

Der erste Schritt der Phageninfektion ist die Adsorption des Phagen an die Wirtszelle. Bei vielen Phagen der Milchsäurebakterien verläuft die Adsorption in zwei Schritten, einer reversiblen und einer irreversiblen Adsorption. Bei *L. lactis*, *S. thermophilus* und *Lb. casei* wurden Zuckerreste der Zellwand als Rezeptoren für die erste, reversible Adsorption beschrieben (Watanabe & Takesue, 1975; Valyasevi *et al.*, 1990; Quiberoni *et al.*, 2000) Für *L. lactis* Phagen der c2-Spezies wurde ein Protein (Pip) beschrieben, das für die zweite, irreversible Adsorption essentiell ist (Geller *et al.*, 1993, Monteville *et al.*, 1994). Obwohl dieses bei vielen *L. lactis* Stämmen vorkommt, ist es nicht für die Infektion der *L. lactis* Phagen der 936-, P335- und 949-Spezies nötig (Kraus & Geller, 1998). Die Injektion der Phagen-DNA in die Zelle ist der nächste Schritt. Hierfür werden verschiedene Mechanismen in Betracht gezogen. Die DNA-Injektion ist vom Energie-Status der Zelle abhängig (Watanabe & Takesue, 1973), wird aber in einem passiven Prozess in die Zelle injiziert, der hauptsächlich durch den Druckunterschied innerhalb und außerhalb des Phagenkopfes getrieben wird (Kindt *et al.*, 2001; Löf *et al.*, 2007). Für die Penetration der Zellwand/-membran können Enzyme eine Rolle spielen (Kenny *et al.*, 2004). Die Ionen Ca^{2+} und Mg^{2+} spielen ebenfalls eine Rolle bei der Phageninfektion, wobei gezeigt wurde, dass diese nicht für die Adsorption der Phagen entscheidend sind

(Geller *et al.*, 2005), sondern entweder als Gegenion für die DNA-Translokation dienen (Alatossava *et al.*, 1987), oder an einem Ca^{2+} -abhängigen, rezeptor-vermittelten DNA-Transport in die Zelle beteiligt sind.

Nachdem die DNA in die Zelle gelangt ist, kann nun entweder der lytische oder lysogene Vermehrungszyklus durchschritten werden. Der lytische Zyklus beginnt direkt mit dem Eintritt der Phagen-DNA in die Zelle und der Einleitung des Abbaus der Wirt-DNA. Anschließend wird die Phagen-DNA repliziert, die Phagen-Proteine werden synthetisiert, zu Phagenpartikeln zusammengesetzt, die DNA wird verpackt und die fertig gestellten Phagenpartikel durch Lyse der Bakterienzelle freigesetzt. Der lysogene Zyklus wird von sog. temperenten Phagen durchschritten. Hierbei wird die Phagen-DNA nach Injektion durch homologe Rekombination in das Wirt-Chromosom integriert und liegt dann als Prophage vor. Das Bakterium wird nun als lysogen bezeichnet und repliziert das Phagengenom bei jeder Vermehrung mit. Durch äußere Stressfaktoren oder auch spontan, kann die Excision der Phagen-DNA eingeleitet werden und somit ein lytischer Zyklus begonnen werden, der zur Freisetzung von Phagen führt.

1.1.2 Allgemeine Morphologie

Zu Beginn wurden die Phagen anhand ihrer Morphologie in die Gruppen A – F eingeteilt (Bradley, 1967). Die Gruppen A – C stehen hierbei für die verschiedenen Morphotypen der Phagen mit Schwänzen, zu denen sämtliche Phagen der Milchsäurebakterien zu zählen sind. Später wurde die Einteilung erweitert und die Gruppen wurden anhand ihrer Kopfform in die Untergruppen 1 – 3 unterteilt (Ackermann & DuBow, 1987). Das „International Committee of Nomenclature of Viruses“ (ICTV) führte schließlich die Einteilung der Phagen in Ordnungen, Familien und Genera ein. Dabei werden Phagen mit kontraktile Schwänzen der Familie der *Myoviridae* (Gruppen A1 – A3) zugeordnet. Phagen mit langen, nichtkontraktile Schwänzen gehören der Familie der *Siphoviridae* (Gruppen B1 – B3) und Phagen mit kurzen, nichtkontraktile Schwänzen der Familie der *Podoviridae* (Gruppen C1 – C3).

1.1.3 Phagen der Milchsäurebakterien

Wirtspezies *Lactococcus lactis*

Laktokokken werden hauptsächlich in mesophilen Starterkulturen eingesetzt und *L. lactis* spp. *lactis* sowie *L. lactis* spp. *cremoris* übernehmen dort die Aufgabe der Säureproduktion. Als Aromaproduzent kommt hier auch das citratverwertende Biovar *L. lactis* spp. *lactis* biovar. *diacetylactis* zum Einsatz (Salminen *et al.*, 2004).

Die *L. lactis* Phagen gehören der Familie der *Siphoviridae* oder der *Podoviridae* an. Sie werden derzeit in zehn Spezies klassifiziert (Abbildung 1.1) (Deveau *et al.*, 2006), die sich anhand ihrer DNA-Homologie unterscheiden lassen. Alle bekannten *L. lactis* Phagen sind strikt virulent, mit Ausnahme der Phagen der P335-Spezies. Diese Spezies beinhaltet auch temperente Phagen, die sich in drei morphologisch unterscheidbare Gruppen unterteilen lassen (r1t-, TP901-1- und BK5-T-Typ). *L. lactis* Phagen sind weit verbreitet und führen in Molkereien häufig zu Fermentationsstörungen. Trotz der hohen Diversität der Laktokokken-Phagen werden weltweit die Spezies 936, c2 und P335 am häufigsten nachgewiesen.

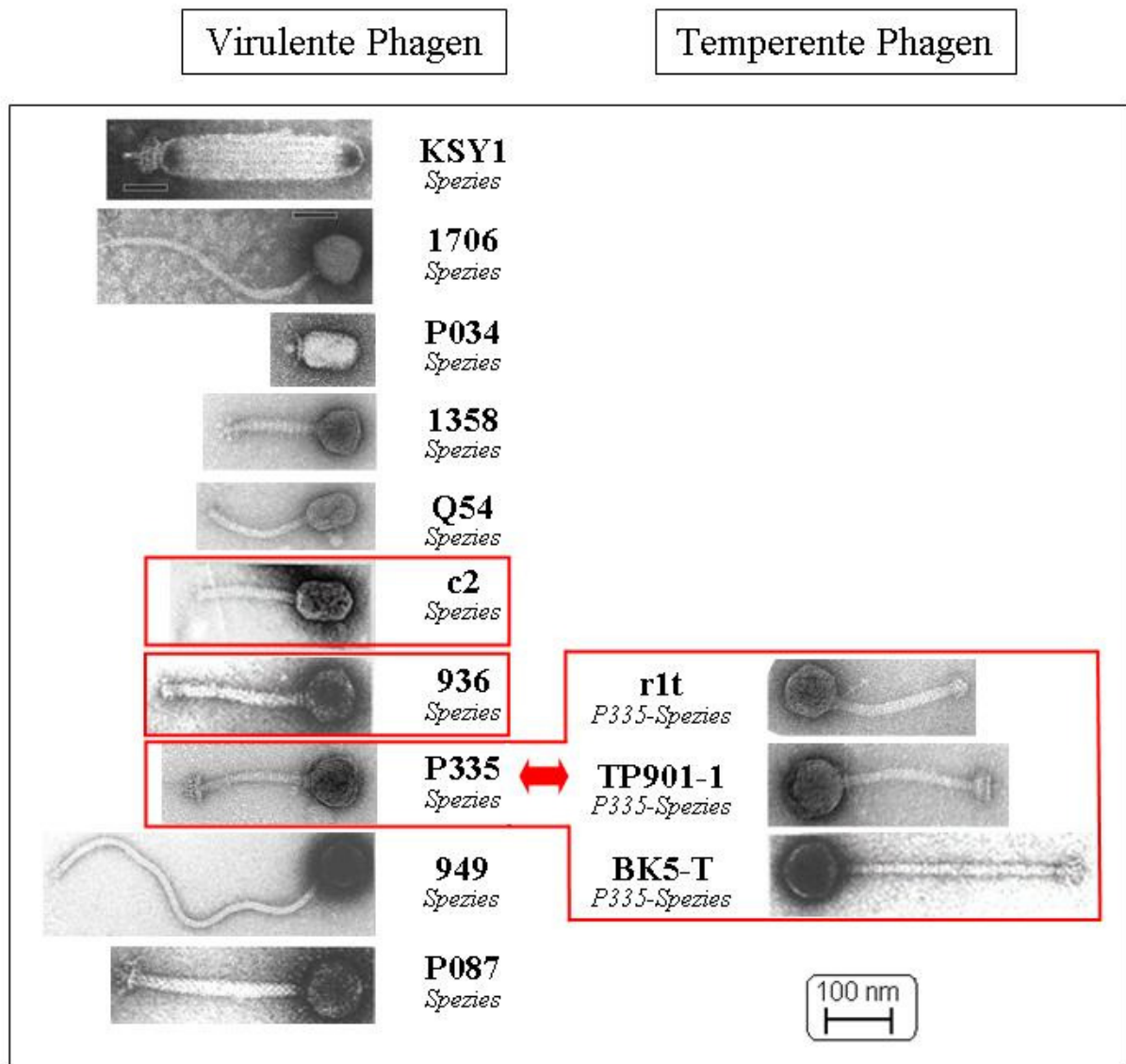


Abbildung 1.1: Klassifizierung der *L. lactis* Phagen (modifiziert nach Josephsen & Neve, 2004; Deveau *et al.*, 2006). Die farbigen Rahmen kennzeichnen die weltweit am häufigsten auftretenden Phagenspezies.

Wirtspezies *Streptococcus thermophilus*

Die Spezies *S. thermophilus* wird in Kombination mit Laktobacillen in thermophilen Starterkulturen eingesetzt, hauptsächlich zur Produktion von Joghurt zusammen mit *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus*.

Alle bisher bekannten *S. thermophilus* Bakteriophagen (Familie der *Siphoviridae*) sind somit morphologisch nicht zu unterscheiden (Abbildung 1.2) (Kivi *et al.*, 1987; Neve *et al.*, 1989). Allerdings lassen sie sich nach dem Verpackungsmechanismus der Phagen-DNA in *cos*-Typ-Phagen mit kohäsiven Enden und *pac*-Typ-Phagen mit einem „Head-Full“-Verpackungsmechanismus differenzieren (LeMarrec *et al.*, 1997). Diese beiden Phagentypen werden auch als Sfi21-Phagen (*cos*-Phagen) und als Sfi11-Phagen (*pac*-Phagen) bezeichnet (Proux *et al.*, 2002). Der Vergleich der Strukturproteinprofile dieser beiden Phagentypen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) hat gezeigt, dass die beiden Phagentypen unterschiedliche Proteinmuster aufweisen: Während *pac*-Phagen drei Hauptstrukturproteine haben, zeigen die *cos*-Phagen zwei Hauptbanden in der SDS-PAGE (Neve *et al.*, 1989; LeMarrec *et al.*, 1997 ; Neve *et al.*, 1998).

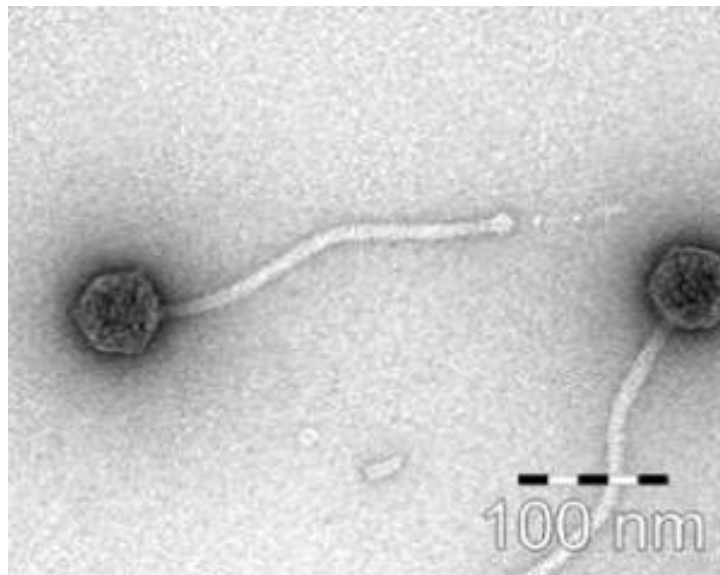


Abbildung 1.2: Typische Morphologie der *S. thermophilus* Phagen (Bild H. Neve, MRI Kiel)

Wirtspezies *Leuconostoc mesenteroides*

Obwohl *Leuconostoc*-Kulturen in Molkereien weit verbreitet sind, wurde über *Leuconostoc* Phagen erst relativ spät berichtet. *Leuconostoc*-Stämme stellen in den mesophilen Starterkulturen mengenmäßig nur einen kleinen Anteil dar (1 – 10 %), haben allerdings entscheidenden Einfluss auf die qualitätsgebenden Eigenschaften der Produkte (Cogan & Jordan, 1994). Inzwischen wurden *Ln. mesenteroides* Phagen in vielen Molkerei-Produkten nachgewiesen und diese Phagen auch näher charakterisiert (Sozzi *et al.*, 1978; Shin & Sato, 1979; Shin & Sato, 1981; Neve *et al.*, 1988; Davey *et al.*, 1995). Taxonomisch lassen sich die Phagen aus Molkereien der Familie der *Myoviridae* (kontraktile Schwänze) und der *Siphoviridae* (nicht-kontraktile Schwänze) zuordnen. Diese Einteilung in zwei Gruppen hat sich auch auf DNA-Ebene bestätigt (Boizet *et al.*, 1992). Es wurden auch lysogene *Leuconostoc*-Stämme in den Starterkulturen nachgewiesen (Shin & Sato, 1980).



Abbildung 1.3: Typische Morphologie eines *Ln. mesenteroides* Phagen der Familie der *Siphoviridae* (Neve *et al.*, 1988).

Wirtspezies *Lactobacillus delbrueckii*

Verschiedene *Lactobacillus* Spezies sind bei der Herstellung von fermentierten Milchprodukten weit verbreitet. Sie werden hierbei sowohl als Starterkultur zur Säureproduktion, als Aromaproduzenten, sowie als Probiotika eingesetzt. Mesophile Laktobacillen treten auch als Nicht-Starter-Milchsäurebakterien bei der Käseproduktion auf und haben dort einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität des Produkts (Peterson & Marshall, 1990). Thermophile Laktobacillen sind z. B. für die Produktion von Joghurt (*Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus*) und Käse (*Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* und *lactis*) unverzichtbar. Bakteriophagen dieser Wirtspezies werden anhand ihrer Serologie und DNA-Homologie in vier Gruppen eingeteilt (a – d) (Mata *et al.*, 1986; Sechaud *et al.*, 1988). Die Phagen werden der Familie der *Siphoviridae* (isodiametrische/prolate Köpfe, lange, nicht-kontraktile Schwänze) zugeordnet. Bemerkenswert ist die hohe Lysogenierate innerhalb dieser Spezies. Zudem besteht, im Gegensatz zu *Lactococcus* Phagen, eine hohe genetische Verwandtschaft von temperenten und virulenten Phagen (Mata *et al.*, 1986).

1.2 Bakteriophagen in der Milchwirtschaft

Fermentationsstörungen durch Bakteriophagen stellen ein großes Problem für die industrielle Milchfermentation dar. Eine Infektion mit Phagen kann zum Ausbleiben der Säuerung führen und somit erhebliche finanzielle Verluste zur Folge haben. Da die Milch in Molkereien nicht unter sterilen Bedingungen verarbeitet werden kann, lässt sich das Risiko einer Phageninfektion nur minimieren, aber nicht gänzlich ausschließen. Innerhalb eines milchverarbeitenden Betriebs gibt es verschiedene Punkte, die als kritisch bzgl. der Phagensicherheit anzusehen sind.

Rohmilch gilt als Hauptquelle für neue Phagen in Molkereien. Auch wenn Phagen hier nur in geringen Titern von bis zu 10^3 PbE/ml vorliegen, können sie sich schnell in den Betrieben etablieren und stabile Phagenpopulationen bilden (Bruttin *et al.*, 1997; Josephsen & Neve, 2004). Starterkulturen können auch an der Verbreitung von Phagen in Betrieben beteiligt sein. Lysogene Stämme können unter bestimmten Bedingungen Phagen freisetzen, und diese Phagen wiederum können sich bei Vorhandensein eines entsprechenden Wirts weiter lytisch vermehren.

Entlang der Produktionslinie können sich die Phagen anreichern: In Molke sind Titer von bis zu 3×10^9 PbE/ml nachgewiesen worden (Neve *et al.*, 1994). Diese extrem phagenhaltige Molke ist eine weitere potentielle Quelle für Rekontaminationen, insbesondere, wenn molkehaltige Aerosole entstehen. In der Nähe der Separatoren konnten von Neve *et al.* (1995) Phagenkonzentrationen bis zu 2×10^8 PbE pro m^3 Raumluft nachgewiesen werden, und selbst in der Nähe der Produktionstanks befanden sich noch 2×10^2 Phagen in jedem m^3 Raumluft. Auch Salzbäder sind einer hohen Phagenbelastung ausgesetzt und hier weisen die Phagen eine ausgesprochene Langzeitstabilität auf (Neve *et al.*, 2005).

1.3 Maßnahmen gegen Bakteriophagen

Um die Produktion gegen Phageninfektionen zu schützen, sind eine Vielzahl von Strategien entwickelt worden. Hier soll nur ein kurzer Überblick über herkömmliche und moderne Ansätze gegeben werden:

- Gewährleistung einer ausreichenden, regelmäßigen thermischen/chemischen Desinfektion,
- Produktion in möglichst geschlossenen Systemen,
- Filtration der eintretenden Luft mit High-Efficiency-Particulate-Air (HEPA)-Filtern,
- Betrieb unter leichtem Überdruck,
- strikte Abtrennung der Kulturenbereitung,
- Vermeidung von Aerosolbildung,
- Ausreichende Hitzebehandlung bei Rückführung von Milchbestandteilen (Molke, Molkenrahm, Molkenprotein) in den Produktionsprozess,
- Kulturenrotation,
- Verwendung von phagenresistenten Starterkulturen/Stämmen.

Seit vielen Jahren wird intensiv über die Mechanismen der Phagenresistenz geforscht und wie man diese auf andere Stämme, im Sinne einer erhöhten Phagensicherheit, übertragen kann. Hierbei werden natürlich auftretende Resistenzmechanismen mit künstlich erzeugten kombiniert. Detaillierte Informationen

zu diesem Thema sind in den Arbeiten von Josephsen & Neve (2004) und McGrath *et al.* (2004) nachzulesen.

1.4 Inaktivierung von Bakteriophagen

Phagen stellen ein permanentes Risiko für bakterielle Fermentationen dar. Diese Gefahr lässt nur minimieren, aber nicht völlig ausschließen. Ein Ziel, um die Fermentationssicherheit in Molkereien zu gewährleisten, ist die weitestgehende Inaktivierung der Phagen.

1.4.1 Methoden zur Inaktivierung von Phagen

Es besteht eine Vielzahl von physikalischen und chemischen Methoden zur Inaktivierung von Phagen. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die Ergebnisse, die in verschiedenen Studien erzielt wurden.

Tabelle 1.1: Inaktivierung von Phagen durch andere physikalische/chemische Methoden

Inaktivierung durch Hochdruck	
Wiederholte Zyklen von Hochdruckbehandlung des Phagen λ bei 0 °C am effektivsten zur Inaktivierung in proteinhaltigen Medien (Blut).	Bradley <i>et al.</i> , 2000
<i>L. lactis</i> Phagen der c2-, 936- und P335-Spezies wurden effektiv durch zyklische Hochdruckbehandlung (200 Mpa) inaktiviert.	Moroni <i>et al.</i> , 2002
Inaktivierung des Phagen λ bei verschiedenen Drücken und in verschiedenen Medien wies ein Tailing auf.	Chen <i>et al.</i> , 2004
Der <i>L. lactis</i> Phage P008 (936-Spezies) war resistenter gegen Hochdruckbehandlung als der <i>L. lactis</i> Phage P001 (c2-Spezies). Die Inaktivierungskinetiken wiesen ein Tailing auf.	Müller-Merbach <i>et al.</i> , 2005b
800 Mpa waren nötig um den Coliphagen Q β und den <i>L. lactis</i> Phagen c2 in Austern vollständig zu inaktivieren.	Smiddy <i>et al.</i> , 2006
Inaktivierung durch Strahlung	
Eine nicht-lethale Dosis von H ₂ O ₂ verstärkte die Inaktivierung des Coliphagen T7 durch Nahes-UV-Licht bei einer Dosis von 54 kJ/m ² .	Hartman <i>et al.</i> , 1979
Inaktivierung des lysogenen <i>Vibrio</i> Kappa-Phagen durch Röntgenstrahlung in Posphatpuffer bei Anwesenheit von Histidin und Cystein (10 mM) am geringsten.	Bhattacharyya <i>et al.</i> , 1991
Inaktivierung des Phagen λ mit Licht (658 nm) nur zusammen mit Porphyrin-Derivaten als Stabilisatoren.	Kasturi & Platz, 1992
Inaktivierung des <i>Lb. casei</i> Phagen PL-1 durch Mikrowellenstrahlung war effektiver als einfache thermische Behandlung.	Kakita <i>et al.</i> , 1995
Photokatalytische Inaktivierung des Coliphagen Q β war mit UV-Licht	Lee <i>et al.</i> , 1998

(254 nm) und TiO ₂ am effektivsten.	
Photokatalytische Inaktivierung des <i>Lb. casei</i> Phagen PL-1 bei Schwarzlicht mit TiO ₂ durch Schädigung der Kapsid-Proteine und darauffolgender DNA-Schädigung.	Kashige <i>et al.</i> , 2001
Photokatalytische Inaktivierung des Coliphagen MS2 am effektivsten bei Schwarzlicht mit TiO ₂ .	Koizumi & Taya, 2002
Inaktivierung durch Chemikalien	
Inaktivierung des <i>Lb. casei</i> Phagen PL-1 durch D-Glucosamin (0,1 M) durch Einzelstrangspaltung der DNA. Phageninaktivierung und DNA-Fragmentierung wurden durch Cu ²⁺ stimuliert.	Watanabe <i>et al.</i> , 1985
Der <i>L. lactis</i> Phage P001 (c2-Spezies) zeigte eine höhere Resistenz gegen Hypochlorid und Peressigsäure/H ₂ O ₂ als der Phage <i>L. lactis</i> Phage P008 (936-Spezies) und der <i>S. thermophilus</i> Phage P53 (<i>cos</i> -Typ). Die Stabilität der Phage erhöhte sich in Anwesenheit von Molke und Magermilch als simulierte Verunreinigungen.	Neve <i>et al.</i> , 1996
<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. paracasei</i> und <i>L. lactis</i> Phagen waren durch Peressigsäure (0,15 %), Hypochlorid (100 – 800 ppm) und Ethanol (75, 100 %) gut zu inaktivieren. Isopropanol zeigte eine deutlich schlechtere inaktivierende Wirkung.	Quiberoni <i>et al.</i> , 1999b; Binetti & Reinheimer, 2000; Suarez & Reinheimer, 2002; Capra <i>et al.</i> , 2004
Ein hitzeresistenter <i>Lb. delbrueckii</i> Phage (Ib ₃) zeigte ebenfalls eine deutlich höhere Resistenz gegen chemische Inaktivierung als andere <i>Lb. delbrueckii</i> Phagen.	Quiberoni <i>et al.</i> , 2003a
Einführung eines quantitativen Suspensionsversuchs zur Bestimmung der viruziden Wirkung gegenüber Bakteriophagen von chemischen Desinfektionsmitteln in den Bereichen Lebensmittel und Industrie.	DIN EN 13610, 2003
50, 75 %ige Ethanol-Lösungen effektiver als 100 % Ethanol bei der Inaktivierung von <i>L. lactis</i> Phagen aus türkischen Molkereien.	Buzrul <i>et al.</i> , 2007

1.4.2 Thermische Inaktivierung

Da Hitze generell zur Inaktivierung unerwünschter Organismen in der Milch verwendet wird, wurde die Thermoresistenz von Phagen der Milchsäurebakterien in verschiedenen Studien untersucht.

Mazé (1946) berichtete, dass drei verschiedene Gruppen von Bakteriophagen in einem Milch-Medium jeweils 5 min bei 80 – 82, 70 und 65 °C zur Inaktivierung benötigten. Dies zeigt, zusammen mit anderen Studien, dass eine herkömmliche Pasteurisierung zur Inaktivierung von Phagen nicht ausreichend sein kann (Wilkowske *et al.*, 1954; Zottola & Marth, 1966; Chopin, 1980; Suarez *et al.*, 2002).

Es wurden verschiedene Suspensionsmedien in den Erhitzungsexperimenten verwendet, um den Einfluss dieser auf die Hitzestabilität zu untersuchen. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse sind unterschiedlich und abhängig von den jeweilig verwendeten Phagen und Medien. Koka & Mikolajc (1967) berichteten von zwei *L. lactis* Phagen, die in Magermilch und Bouillon erhitzt wurden. Beide Phagen unterschieden sich in ihrer Thermostabilität und Kinetik, doch für beide hatte Magermilch einen schützenden Einfluss. In einer weiteren Untersuchung wurden vier *L. lactis* Phagen in einem niedermolaren Salzpuffer (TMG), Magermilch und Bouillon erhitzt (Suarez & Reinheimer, 2002). Die Phagen wiesen eine unterschiedliche Hitze-resistenz auf, aber bei allen Phagen war sie in TMG-Puffer am höchsten und im Suspensionsmedium Bouillon am niedrigsten. Ebenso wurde dies für vier *Lb. delbrueckii* Phagen nachgewiesen (Quiberoni *et al.*, 2003a). Die Phagen unterschieden sich in ihrer Thermoresistenz, doch bei allen hatte Magermilch einen schützenden Effekt. Quiberoni *et al.* (1999) konnten bei vier *Lb. helveticus* Phagen allerdings keinen klaren Einfluss des Suspensionsmediums feststellen, da einige der untersuchten Phagen bei den Erhitzungen in Bouillon stabiler waren, andere in TMG-Puffer. Binetti & Reinheimer (2000) untersuchten fünf *S. thermophilus* Phagen auf ihre Hitzestabilität in TMG-Puffer, Magermilch und Bouillon. Der Phage O21-4 wies in Bouillon die geringste Thermostabilität auf, in den anderen beiden Medien waren keine Unterschiede bei diesem Phagen zu erkennen. Bei den anderen untersuchten Phagen wurde kein Einfluss des Suspensionsmediums auf die Hitzestabilität festgestellt. Der gut charakterisierte *L. lactis* Phage P008 wurde in Vollmilch und Bouillon erhitzt (Müller-Merbach *et al.*, 2005a) und hier wurde ein deutlich schützender Effekt der Milch festgestellt. Für den schützenden Effekt der Milch sind verschiedene Bestandteile verantwortlich gemacht worden (Tabelle 1.2). Einige Studien deuten darauf hin, dass Fett (Chopin, 1980) und Lactose (Daoust *et al.*, 1965) nicht für den Schutzeffekt verantwortlich sind.

Tabelle 1.2: Milchbestandteile mit Schutzwirkung auf die Hitzestabilität von Phagen

Milchkomponente	Referenz
Milchprotein	Hunter, 1944; Fabrizio <i>et al.</i> , 1999
Casein	M. Müller-Merbach (pers. Mitteilung)
Milchfett	Fabrizio <i>et al.</i> , 1999
Salze	Daoust <i>et al.</i> , 1965
Pufferkapazität der Milch	Fabrizio <i>et al.</i> , 1999

Generell wurde eine unterschiedliche Hitzestabilität für die Phagen der verschiedenen Wirtspezies dokumentiert. So erwiesen sich *S. thermophilus* Phagen hitzestabiler als Phagen der Wirtspezies *Lb. delbrueckii* (Quiberoni *et al.*, 2003a), *Lb. helveticus* (Quiberoni *et al.*, 1999b) und *Lb. casei/paracasei* (Capra *et al.*, 2004). *L. lactis* Phagen wiesen dagegen eine leicht höhere Thermostabilität als *S. thermophilus* Phagen auf (Zottola & Marth, 1966; Suarez *et al.*, 2002; Müller-Merbach & Hinrichs, 2006).

Auch innerhalb der verschiedenen Phagenspezies wurden deutliche Unterschiede bzgl. der Hitzeresistenz festgestellt. Chopin (1980) überprüfte 17 *L. lactis* Phagen auf ihre Thermostabilität und stellte deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Phagen fest. In einer weiteren Studie wurden insgesamt 107 *L. lactis* Phagen isoliert durch PCR-Untersuchungen in die Spezies c2, 936 und P335 eingeteilt. Bei der Untersuchung der Thermoresistenz dieser Phagenisolate erwiesen sich die Isolate der 936-Spezies als deutlich hitzeresistenter als die Isolate der c2- und P335-Spezies. Dies wurde von Müller-Merbach *et al.* (2005b) nochmals bestätigt, die für den *L. lactis* Phagen P008 (936-Spezies) eine höhere Hitzeresistenz als für den *L. lactis* Phagen P001 (c2-Spezies) festgestellt haben.

Die Hitzeinaktivierung von Phagen wurde lange Zeit als linearer Prozess betrachtet (Adams, 1959). Es wurden weiterhin lineare Verläufe der Inaktivierungskinetik beschrieben (Hiatt, 1964; Koka & Mikolajc, 1967), doch die Mehrzahl der Kinetiken unterschieden sich deutlich von einem linearen Verlauf und wiesen ein sog. „Tailing“ auf (Wilkowske *et al.*, 1954; Zottola & Marth, 1966; Koka & Mikolajc, 1970; Chopin, 1980; Binetti & Reinheimer, 2000; Suarez & Reinheimer, 2002; Müller-Merbach *et al.*, 2005a). Aus diesem Grund können die Inaktivierungsreaktionen nicht mit D- und Z-

Werten beschrieben werden, da hierfür Reaktionen 1. Ordnung zu Grunde liegen. Als Ursache für die fehlende Linearität wurden verschiedene Modelle diskutiert. Ein Grund könnte das Vorliegen einer heterogenen Population sein, mit hitzestabilen und hitzelabilen Phagen (Hiatt, 1964). Dies wurde jedoch als wenig wahrscheinlich betrachtet, da dieser bimodale Charakter der Inaktivierungskinetiken nicht bei allen Erhitzungsbedingungen auftrat (Daoust *et al.*, 1965). Das Verklumpen von Phagen zu Aggregationen wird ebenfalls als Ursache für das Auftreten von „Tailing“ betrachtet (Suarez & Reinheimer, 2002). Als wahrscheinlicher wird ein zweistufiger Prozess der Phageninaktivierung angesehen, der die Denaturierung von Proteinen und DNA beinhaltet (Zottola & Marth, 1966; Koka & Mikolajc, 1967; Koka & Mikolajc, 1970; Müller-Merbach *et al.*, 2005a; Müller-Merbach *et al.*, 2005b).

1.5 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit war Teil des AiF-Projekts 1433N: „Erhöhte Prozesssicherheit durch an das Suspensionsmedium adaptierte thermische Inaktivierung von Bakteriophagen.“ Die Infektion von Milchsäurebakterien mit Phagen stellt ein großes Problem für bakterielle Fermentationen in der Milchindustrie dar. Da schon seit längerem bekannt ist, dass Phagen die Standard-Pasteurisierung überleben, sollen mit dieser Arbeit genaue Daten über die Thermoresistenz von Phagen der mesophilen und thermophilen Milchsäurebakterien ermittelt, der aktuelle Phagenstatus in deutschen Molkereien mittels eines Phagenmonitorings bestimmt, die Phagen differenziert und Phagen mit extremer Hitzeresistenz genauer untersucht werden. Der Einfluss des Suspensionsmediums auf die Hitzestabilität von Phagen soll geprüft werden und welche Auswirkungen äußere Stressfaktoren (erhöhter Salzgehalt, Hitze, Trockenheit) auf die Entwicklung von Hitzeresistenz haben. Die Untersuchung von erhitzten Phagensuspensionen im Transmissionselektronenmikroskop soll die Effekte einer erhöhten Temperatur auf die Phagenpartikel aufzeigen. Diese Arbeit soll dazu dienen, die Fermentationssicherheit in Molkereien zu erhöhen und die biologischen Parameter der Hitzeresistenz von Phagen zu beschreiben.

2 Material und Methoden

2.2 Nährmedien, Lösungen und Puffer

2.2.1 Nährmedien

Die Nährmedien wurden mit zweifach entionisiertem Wasser (aqua pur) angefertigt (SG-Reinstwasser-System Clear) und soweit nicht anders angegeben, für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Um aus den Medien Nähragar herzustellen, wurden 15 g/l (Unterschichtagar) oder 7,5 g/l (Softagar) Bacto™ Agar (Becton, Dickinson, Cockeysville) zugegeben.

LM17 bzw. GM17 für *L. lactis*

(Terzaghi & Sandine, 1975)

5 g	Phyton Pepton
5 g	Poly Pepton
2,5 g	Hefeextrakt
5 g	Fleischextrakt
5 g	Lactose bzw. Glucose
0,5 g	Ascorbinsäure
19 g	Dinatrium-β-Glycero-Phosphat
0,25 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1 ml	1 M CaCl ₂
ad 1 l mit aqua pur	

LM17 für *S. thermophilus*

(Krusch *et al.*, 1987)

wie LM17 für <i>L. lactis</i> , jedoch mit	
9,5 g	Dinatrium-β-Glycero-Phosphat

Im Falle des Unterschichtagars erfolgte die Zugabe von CaCl₂ und Lactose, bzw. Glucose erst nach dem Autoklavieren.

MRS für *Lb. delbrueckii* und

Ln. mesenteroides

52 g	MRS broth (Roth)
ad 1 l mit aqua pur	

Bei der Herstellung von Glycin-Unterschichtagar wurde der Agar (1 %) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Die verwendete Glycinmenge richtete sich nach dem jeweiligen Stamm.

Stammlösung für Glycin-Softagar
(mod. nach Lillehaug, 1997)

1,2 g	Phyton Pepton
1,2 g	Poly Pepton
1 g	Hefeextrakt
1,65 g	Fleischextrakt
1,2 g	Caseinhydrolysat
0,2 g	Ascorbinsäure
6,35 g	Dinatrium-β-Glycero-Phosphat
0,16 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	ad 500 ml mit aqua pur

Die Lösung wurde sterilfiltriert (Filterporenweite 0,45 µm, Whatman[®], Schleicher & Schüll, Dassel) und bis zur Verwendung bei 50 °C gelagert.

Glycin-Softagar (mod. nach Lillehaug, 1997)

0,8 g	Elliker-Bouillon
0,15 g	Agar
50 ml	Stammlösung

Elliker-Bouillon

(Elliker *et al.*, 1956)

48,5 g	Elliker Fertigmedium
	ad 1 l mit aqua pur

Magermilch

100 g	Magermilchpulver
	ad 1 l mit aqua pur

Lackmusmilch

100 g	Magermilchpulver
70 ml	Kubel-Tiemanns-Lackmuslösung
	ad 1 l mit aqua pur

HGL-Milch

100 g	Magermilchpulver
10 g	Glucose
3 g	Hefeextrakt
25 ml	Kubel-Tiemanns-Lackmuslösung
	ad 1 l mit aqua pur

Magermilch, Lackmusmilch und HGL-Milch wurden durch Tyndallisierung an 3 aufeinander folgenden Tagen im Dampftopf bei 100 °C für 30 min sterilisiert.

Indikatormedium für Mikrotiterest

100 ml Magermilch
 20 ml Elliker-Bouillon
 1 ml Bromkresolpurpurlösung (Stammlösung 100mg/10ml)

2.2.2 Allgemeine Lösungen und Puffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Lösungen für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Tris-HCl-Puffer und EDTA-Lösungen wurden aus Stammlösungen zugefügt.

Phagen-Verdünnungslösung

¼-starke Ringerlösung
 10 % LM17-Bouillon
 ad 1 l mit aqua pur

SM-Puffer

100 mM NaCl
 10 mM MgSO₄ x 7H₂O
 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 1 mM EDTA (pH 8,0)

2.2.3 Lösungen zur DNA Präparation und Analyse

50 x TAE Stammlösung

40 mM Tris-HCl
 0,5 M EDTA
 5,7 % Eisessig
 pH 8,0 einstellen
 ad 1 l mit aqua pur

6 x DNA Auftragspuffer

0,25 % Bromphenolblau
 0,25 % Xylencyanol
 30 % Glycerin

<u>Phagen-Dialysepuffer</u>	250 mM Tris-HCl	<u>Denaturierungslösung</u>	0,5 M NaOH
	50 mM NaCl		1,5 M NaCl
	50 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	<u>Neutralisierungslösung</u>	0,5 M Tris-HCl
	pH 8,0 einstellen		3 M NaCl
			pH 7,5 einstellen
<u>20 x SSC</u>	300 mM tri-Na-citrat	<u>Waschpuffer 1</u>	2 fach SSC
	3 M NaCl		0,1 % SDS
	pH 7,0 einstellen	<u>Waschpuffer 2</u>	0,1 fach SSC
			0,1 % SDS
			pH 7,5 einstellen
<u>10 x Puffer1</u>	100 mM Maleinsäure	<u>Tween Waschlösung</u>	1 fach Puffer 1
	150 mM NaCl		0,3 % Tween 20
	pH 7,5 einstellen	<u>10 x Puffer 2</u>	1 fach Puffer 1
			10 % Blocking Powder
			pH 7,5 einstellen
<u>Puffer 3</u>	100 mM Tris-HCl	<u>10 x TBE</u>	0,89 M Tris-HCl
	100 mM NaCl		0,89 M Borsäure
	pH 9,5 einstellen		0,025 M EDTA
			pH 8,4 einstellen

2.2.4 Lösungen zur Proteinanalyse

<u>Elektrophorese-Puffer:</u>	25 mM	Tris HCl	<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	1013 ml	Methanol
	250 mM	Glycerin		133 ml	Eisessig
	0,1 %	SDS		2,5 g	Coomassie-Brilliant-Blau
	pH 8,4 einstellen			1057,5 ml	aqua pur

<u>Entfärbelösung:</u>	150 ml	Methanol
	75 ml	Eisessig
	ad 1 l mit aqua pur	

2.3 Verwendete Kulturen und Phagen

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden frische o/n-Kulturen 1%ig in Lackmusmilch (bzw. HGL-Milch bei lactose-negativen Stämmen) überimpft, für 2 h bei 30 °C bzw. 40 °C inkubiert und bei -70 °C eingefroren. Phagenlysate wurden 13%ig mit Glycerin versetzt und bei -70 °C eingefroren.

Tabelle 2.1: *L. lactis* Phagen mit zugehörigen Wirtstämmen

Bezeichnung	Spezies	Wirtstamm	Besonderheiten/Herkunft	Referenz
P001	c2	F7/2	Typphage der c2-Spezies	Jarvis <i>et al.</i> , 1991
P624	c2	6.3Lc8	Betrieb 6	diese Arbeit
P625	c2	6.3Lc8	Betrieb 6	diese Arbeit
P635	c2	11.1Lc10	Betrieb 11	diese Arbeit
P636	c2	11.1Lc10	Betrieb 11	diese Arbeit
P638	c2	11.1Lc10	Betrieb 11	diese Arbeit
P653	c2	6.3Lc2	Betrieb 3	diese Arbeit
P654	c2	6.3Lc15	Betrieb 3	diese Arbeit
P655	c2	6.3Lc15	Betrieb 3	diese Arbeit
P684	c2	5.2Lc5	Betrieb 5	diese Arbeit
CHPC204	c2	30.Lc43	Kulturenhersteller	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 2.1

Bezeichnung	Spezies	Wirtstamm	Besonderheiten/Herkunft	Referenz
CHPC364	c2	30.Lc43	Kulturenhersteller	diese Arbeit
CHPC649	c2	30.Lc43	Kulturenhersteller	diese Arbeit
P008	936	F7/2	Typphage der 936-Spezies	Jarvis <i>et al.</i> , 1991
936	936	158		Jarvis, 1984
sk1	936	MG1363		Chandry <i>et al.</i> , 1997
P618	936	20.Lc49	Betrieb 14	diese Arbeit
P620	936	2.9Lc21	Betrieb 2	diese Arbeit
P622	936	2.9Lc23	Betrieb 2	diese Arbeit
P623	936	5.4Lc1	Betrieb 5	diese Arbeit
P626	936	7.5Lc6	Betrieb 7	diese Arbeit
P627	936	7.5Lc6	Betrieb 7	diese Arbeit
P628	936	7.5Lc6	Betrieb 7	diese Arbeit
P629	936	8.3Lc12	Betrieb 8	diese Arbeit
P630	936	8.3Lc15	Betrieb 8	diese Arbeit
P632	936	10.3Lc7	Betrieb 10	diese Arbeit
P633	936	10.3Lc16	Betrieb 10	diese Arbeit
P634	936	10.3Lc20	Betrieb 10	diese Arbeit
P637	936	11.4Lc3	Betrieb 11	diese Arbeit
P639	936	12.4Lc15	Betrieb 12	diese Arbeit
P640	936	12.4Lc11	Betrieb 12	diese Arbeit
P641	936	12.4Lc13	Betrieb 12	diese Arbeit
P642	936	15.2Lc14	Betrieb 15	diese Arbeit
P645	936	11.4Lc2	Betrieb 11	diese Arbeit
P646	936	11.4Lc2	Betrieb 11	diese Arbeit
P647	936	11.4Lc2	Betrieb 11	diese Arbeit
P648	936	11.4Lc2	Betrieb 11	diese Arbeit
P649	936	11.1Lc19	Betrieb 11	diese Arbeit
P650	936	11.4Lc2	Betrieb 11	diese Arbeit
P651	936	11.1Lc8	Betrieb 11	diese Arbeit
P652	936	11.1Lc19	Betrieb 11	diese Arbeit
P656	936	15.2Lc1	Betrieb 15	diese Arbeit
P657	936	15.2Lc14	Betrieb 15	diese Arbeit
P658	936	15.2Lc1	Betrieb 15	diese Arbeit
P659	936	15.2Lc14	Betrieb 15	diese Arbeit
P660	936	15.2Lc1	Betrieb 15	diese Arbeit
P661	936	15.2Lc14	Betrieb 15	diese Arbeit
P662	936	15.2Lc1	Betrieb 15	diese Arbeit
P663	936	15.2Lc14	Betrieb 15	diese Arbeit
P664	936	15.2Lc1	Betrieb 15	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 2.1

Bezeichnung	Spezies	Wirtstamm	Besonderheiten/Herkunft	Referenz
P665	936	15.2Lc14	Betrieb 15	diese Arbeit
P666	936	15.2Lc1	Betrieb 15	diese Arbeit
P667	936	15.2Lc14	Betrieb 15	diese Arbeit
P668	936	15.2Lc1	Betrieb 15	diese Arbeit
P669	936	15.2Lc14	Betrieb 15	diese Arbeit
P670	936	15.2Lc1	Betrieb 15	diese Arbeit
P671	936	15.2Lc14	Betrieb 15	diese Arbeit
P672	936	15.2Lc1	Betrieb 15	diese Arbeit
P673	936	15.2Lc14	Betrieb 15	diese Arbeit
P680	936	F7/2		Müller-Merbach & Hinrichs, 2006
P681	936	11.1Lc8	Betrieb 7	diese Arbeit
P682	936	8.3Lc1	Betrieb 8	diese Arbeit
P683	936	7.5Lc6	Betrieb 8	diese Arbeit
P685	936	5.4Lc1	Betrieb 5	diese Arbeit
P4565	936	20.Lc21	Kulturenhersteller	diese Arbeit
P1532	936	20.Lc18	Kulturenhersteller	diese Arbeit
P1569	936	20.Lc11	Kulturenhersteller	diese Arbeit
P404	936	20.Lc6		Laborius, 2004
P449	936	20.Lc91		Laborius, 2004
P482	936	20.Lc22		Laborius, 2004
P494	936	20.Lc49		Laborius, 2004
P506	936	20.Lc49		Laborius, 2004
P520	936	20.Lc49		Laborius, 2004
P538	936	20.Lc49		Laborius, 2004
P543	936	20.Lc49		Laborius, 2004
P545	936	20.Lc49		Laborius, 2004
P551	936	20.Lc49		Laborius, 2004
P707	936	20.Lc49		Institutsammlung
P335	P335	F7/2	Typphage der P335-Spezies	Jarvis <i>et al.</i> , 1991
P581	P335	1478		Institutsammlung
P204	P335	S8/3		Institutsammlung
r1t	P335-[r1t]	R1K10	Typphage der P335-[r1t]-Spezies	van Sinderen <i>et al.</i> , 1996
P643	P335-[r1t]	17.4Lc5		diese Arbeit
P644	P335-[r1t]	17.4Lc5		diese Arbeit
P566	P335-[r1t]	40.Lc64		Institutsammlung
P706	P335-[r1t]	40.Lc1-1		Institutsammlung
TP901-1	P335-[TP901-1]	3107	Typphage der P335-[TP901-1]-Spezies	Brondsted <i>et al.</i> , 2001
TP901-BC1034	P335-[TP901-1]	3107	Phage mit Erythromycin-Resistenz-Gen	Koch <i>et al.</i> , 1997

Fortsetzung Tabelle 2.1

Bezeichnung	Spezies	Wirtstamm	Besonderheiten/Herkunft	Referenz	
BK5-T	P335-[BK5-T]	H2	Typphage der P335-[BK5-T]-Spezies	Mahanivong <i>et al.</i> , 2001	
P553	P335-[BK5-T]	773		Institutsammlung	
P572	P335-[BK5-T]	773		Institutsammlung	
P606	P335-[BK5-T]	40.Lc18		Institutsammlung	
CHPC412	P335-[BK5-T]	30.LcY1		Kulturenhersteller	diese Arbeit
P034	P034	F7/2	Typphage der P034-Spezies	Jarvis <i>et al.</i> , 1991	
P369	P034	F7/2		Institutsammlung	
Q54	Q54	SMQS62	Typphage der Q54-Spezies	Deveau <i>et al.</i> , 2006	
P570	949	1306		Institutsammlung	
CHPC21	949	30.LcY1		Kulturenhersteller	diese Arbeit
CHPC310	949	30.LcY1		Kulturenhersteller	diese Arbeit
P087	P087	C10	Typphage der P087-spezies	Jarvis <i>et al.</i> , 1991	
P596	P087	752		Institutsammlung	
P446	1358	Wg2		Institutsammlung	

Tabelle 2.2: *S. thermophilus* Phagen mit zugehörigen Wirtstämmen

Bezeichnung	Typ	Wirtstamm	Herkunft	Referenz	
PSt	<i>cos</i>	St ^a		Neve <i>et al.</i> , 1989	
P53	<i>cos</i>	55n ^b		Neve <i>et al.</i> , 1989	
a10/J9	<i>cos</i>	a10 ^c		Neve <i>et al.</i> , 1989	
P1109	<i>cos</i>	St 11 ^b		Ammann <i>et al.</i> , 2008	
P619	<i>cos</i>	2.6Sc1		Betrieb 2	diese Arbeit
P621	<i>cos</i>	2.6Sc1		Betrieb 2	diese Arbeit
P631	<i>cos</i>	9.5Sc2		Betrieb 9	diese Arbeit
CHPC 1005	<i>cos</i>	30.Sc23		Kulturenhersteller	diese Arbeit
CHPC 1006	<i>cos</i>	30.Sc25		Kulturenhersteller	diese Arbeit
CHPC 1014	<i>cos</i>	30.Sc27		Kulturenhersteller	diese Arbeit
CHPC 572	<i>cos</i>	30.Sc30		Kulturenhersteller	diese Arbeit
CHPC 595	<i>cos</i>	30.Sc34		Kulturenhersteller	diese Arbeit
FAPC254	<i>cos</i>	St1		Kulturenhersteller	diese Arbeit
P6	<i>pac</i>	S6 ^d		Kulturenhersteller	Neve <i>et al.</i> , 1989
P8	<i>pac</i>	S8 ^d	Neve <i>et al.</i> , 1989		
CHPC 640	<i>pac</i>	30.Sc48	diese Arbeit		

^a : Zugabe von 0,5 % Glycin zu Unterschicht- und Softagar

^b : Zugabe von 0,25 % Glycin zu Unterschicht- und Softagar

^c : Zugabe von 0,13 % Glycin zu Unterschicht- und Softagar

^d : Zugabe von 0,25 % Glycin zu Unterschichtagar und 0,13 % Glycin zu Softagar

Tabelle 2.3: *Ln. mesenteroides* Phagen mit zugehörigen Wirtstämmen

Bezeichnung	Wirtstamm	Herkunft	Referenz
P958	20.Ln4	Kulturenhersteller	diese Arbeit
P728	20.Ln4	Kulturenhersteller	diese Arbeit
P4556	20.Ln19	Kulturenhersteller	diese Arbeit
P1594	20.Ln4	Kulturenhersteller	diese Arbeit
P1599	20.Ln19	Kulturenhersteller	diese Arbeit

Tabelle 2.4: *Lb. delbrueckii* Phagen mit zugehörigen Wirtstämmen

Bezeichnung	Subspezies	Wirtstamm	Herkunft	Referenz
LL-H	<i>lactis</i>	ATCC15808		Mikkonen <i>et al.</i> , 1996
P1508	<i>bulgaricus</i>	20.Lb1-1	Kulturenhersteller	diese Arbeit
CHPC658	<i>bulgaricus</i>	30.Lb84	Kulturenhersteller	diese Arbeit

2.4 Bestimmung der Phagentiter durch Plaques- bzw. Spotttest

Die Phagenlysate wurden in seriellen Verdünnungsreihen in Phagenverdünnungslösung verdünnt. Für den Plaquetest wurden 100 µl dieser Verdünnungen mit 100 µl 40 mM CaCl₂ und 300 µl einer spätlogarithmischen Wirtskultur gemischt. Die Ansätze wurden für 10 min bei RT inkubiert und anschließend mit 2,5 ml geschmolzenem Softagar (50 °C) auf LM17 Nährboden aufgetragen. Zu den Ansätzen für *S. thermophilus* Wirtstämmen wurden 100 µl Magermilch hinzugefügt. Die Platten wurden o/n bei 30 °C bzw. 40 °C inkubiert. Bei den Spotttests wurden 100 µl 40 mM CaCl₂ und 300 µl einer spätlogarithmischen Wirtskultur mit 2,5 ml geschmolzenem Softagar (50 °C) gemischt und auf LM17 Nährboden aufgetragen. Von den Phagenverdünnungen wurden von jeder Stufe 20 µl auf den festen Softagar gespottet.

2.5 Isolierung der Phagen

Aus Platten des Plaquetests mit isolierten Einzelplaques wurden Plaques ausgestochen und in 0,5 ml Bouillon übertragen. Danach wurden jeweils 100 µl 40 mM

CaCl₂ und 300 µl Kultur hinzugegeben. Es wurde 10 min bei RT inkubiert, anschließend 5 ml der jeweiligen-Bouillon hinzugefügt und bei 30 °C bzw. 40 °C bis zur Lyse inkubiert. Danach wurden die Ansätze sterilfiltriert (Filterporenweite 0,45 µm, Whatman[®], Schleicher & Schüll, Dassel) und die Phagentiter im Plaquetest bestimmt.

2.6 Herstellung von Phagenlysaten

2.6.1 Anzucht in Bouillon

Zu 300 µl einer spätlogarithmischen Wirtskultur wurden 100 µl 40 mM CaCl₂ und 100 µl des jeweiligen Phagenlysats hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert und anschließend wurden 5 ml der jeweiligen Wachstumsbouillon hinzugegeben. Der Ansatz wurde bis zur Lyse inkubiert und danach sterilfiltriert. Für Ansätze im größeren Volumen wurden die Mengen entsprechend hochgerechnet.

2.6.2 Abwaschen von Platten mit konfluenter Lyse

Auf die Platten eines Plaquetest mit konfluenter Lyse (feiner, netzartiger Bakterienrasen) wurden 5 ml des entsprechenden Suspensionsmediums gegeben. Diese wurden für 1 h bei RT leicht geschüttelt und anschließend wurde die Suspension sterilfiltriert (Filterporenweite 0,45 µm, Whatman[®], Schleicher & Schüll, Dassel) und der Titer mittels Plaquetest bestimmt.

2.7 Anreicherung und Reinigung von Phagen mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

2.7.1 Anreicherung der Phagen

Dem Lysat (500 – 1000 ml, hergestellt wie in 2.5.1) wurden je 1 µg/ml RNAse und DNase zugegeben. Anschließend wurde es für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 1 M NaCl hinzugegeben und dies 1 h bei 4 °C gelöst. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde der Ansatz bei 6.300 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Zur Fällung der Phagen wurde dem Überstand 10%ig PEG-6000 hinzugegeben und der Ansatz für 3 h oder o/n bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurde das Lysat bei 8.600 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in SM-Puffer resuspendiert.

2.7.2 Aufreinigung der Phagen

Zur Reinigung und endgültigen Konzentration der Phagen wurde folgender CsCl-Gradient aufgebaut: 1 ml CsCl-Lösung mit einer Dichte von $\delta = 1,7$; 1 ml CsCl-Lösung $\delta = 1,5$; 2 ml CsCl-Lösung $\delta = 1,45$; 2 ml CsCl-Lösung $\delta = 1,4$; 4 ml CsCl-Lösung $\delta = 1,3$; 2 ml CsCl-Lösung $\delta = 1,2$ wurden in einem Zentrifugenröhrchen (Polyallomer Centrifuge Tubes, Beckman) vorsichtig übereinander pipettiert und mit 5 ml des unter 2.7.1 gewonnenen Phagenlysats überschichtet. Der Gradient wurde bei $114.000 \times g$ für 21-22 h bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Die entstandene Phagenbande wurde mit einer Spritze entnommen oder der Gradient ausgetropft.

2.8 DNA Extraktion und Analyse

2.8.1 Isolierung von Phagen DNA – Schnellmethode

Dem Lysat (50 – 100 ml) wurden je $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ RNAse und DNAse zugegeben. Anschließend wurde es für 1 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Danach wurde das Lysat bei $27.000 \times g$ für 2 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in $600 \text{ } \mu\text{l}$ TE-Puffer (pH 7,5) o/n bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelöst. Anschließend wurde Proteinase K ($50 \text{ } \mu\text{g/ml}$), 20 mM EDTA und 0,5%ig SDS hinzugegeben und 3 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach Abkühlen auf RT wurde die DNA durch Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) Extraktion isoliert. Dabei wurde das gleiche Volumen Phenol hinzugegeben, 30 x vorsichtig invertiert und anschließend 5 min bei $10.800 \times g$ zentrifugiert. Der klare, wässrige Überstand wurde abgenommen und abermals mit dem gleichen Volumen Phenol 30 x invertiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde dem wässrigen Überstand das gleiche Volumen Chloroform/Isoamylalkohol hinzugegeben, 30 x invertiert und wie oben zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, der Überstand abgenommen, mit dem gleichen Volumen 96%igem Ethanol und 0,3 M Na-Acetat (pH 7) versetzt und die DNA für 1 h bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gefällt. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min bei $20.800 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit dem gleichen Volumen 70%igem Ethanol versetzt und durch nochmaliges Zentrifugieren gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für 5 min bei RT getrocknet und anschließend in TE-Puffer (pH 8) bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ o/n gelöst.

2.8.2 Isolierung von Phagen DNA aus CsCl-Präparationen

Zur Isolierung der Phagen DNA wurde 1 ml CsCl-Lysat in einen Dialyseschlauch pipettiert und 2 x 1 h gegen 1 l Dialysepuffer bei RT dialysiert. Danach wurde dem Lysat wie unter 2.8.1 beschrieben Proteinase K, EDTA und SDS hinzugefügt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Extraktion der DNA durch Phenol/Chloroform (2.8.1) wurde der wässrige Überstand in einen Dialyseschlauch gegeben und o/n 3 x gegen 1 l TE-Puffer bei 4 °C dialysiert. Das Dialysat wurde bei ausreichendem DNA-Gehalt direkt verwendet oder andernfalls die DNA mittels Ethanol/Na-Acetat gefällt (2.8.1).

Für die Isolierung von Phagen DNA aus kleinen CsCl-Lysat-Volumina wurden 100 µl CsCl-Lysat auf eine Nitrocellulose-Membran gespottet (Filterporenweite 0,025 µm, Millipore Corporation, Billerica) und 0,5 h gegen 20 ml 1 x Dialysepuffer bei RT dialysiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

2.8.3 Restriktionshydrolyse

Die Hydrolyse der DNA wurde entsprechend den Empfehlungen der Hersteller der Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 37 °C im Thermomixer (Thermomixer 5436, Eppendorf).

2.8.4 Agarosegelelektrophorese

Es wurden 0,8%ige bzw. 1,5%ige (w/v) Agarose-Minigele (10 cm x 7 cm x 0,5 cm) verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TAE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und als Horizontalgel gegossen. Die DNA-Proben wurden 1:6 mit dem DNA Auftragspuffer (Dye) gemischt, und die Elektrophorese erfolgte bei 75 V für 30 – 90 min in 1 x TAE. Anschließend wurde das Gel für 10 min mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und nach einem 10 minütigen Entfärbungsschritt in aqua pur unter UV-Licht fotografiert (Biorad ChemiDoc™ XRS, Software: Quantity One™ 4.5.2).

2.8.5 Untersuchung der Genomorganisation

2.8.5.1 Erhitzung der DNA

DNA-Moleküle, die kohäsive Enden („sticky ends“) aufweisen, liegen in DNA-Präparationen teilweise in zirkulärer Form vor. Dieser Ringschluss, durch Wasserstoffbrückenbindungen der komplementären Basen, kann durch Erhitzen der DNA gelöst werden (Hershey *et al.*, 1963). Im Restriktionsprofil wird dies durch DNA-Banden deutlich, die nach Erhitzung in zwei kleinere Banden zerfallen.

Um das Auftreten von zusätzlichen DNA-Banden zu überprüfen, wurde der Restriktionsansatz für 15 min bei 70 °C erhitzt, danach sofort auf Eis abgekühlt und mit Dye versetzt. Der Ansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und das Bandenmuster mit der unerhitzten Kontrolle verglichen.

2.8.5.2 Ligation

Zur Ligation wurde die zu prüfende DNA in einem 500 µl Ansatz mit T4-Ligase und Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot) gemischt und 3 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol/Na-Acetat Fällung der DNA. Die DNA wurde wie oben beschrieben hydrolysiert, erhitzt und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

2.8.6 DNA-DNA-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter Sonde

2.8.6.1 Herstellung der DIG-markierten DNA-Sonde

Die Markierung der DNA-Sonde wurde mit dem „DIG DNA Labeling Kit“ (Roche) durchgeführt. 2 µg der zu markierenden DNA wurden mit dem jeweiligen Enzym geschnitten, anschließend wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol/Na-Acetat Fällung durchgeführt und die DNA in 20 µl TE (pH 8) gelöst. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 100 °C gekocht und sofort in einem Eis/NaCl-Bad abgekühlt. Für die DNA-Markierung wurde diesem Ansatz 10 µl 10 x Hexanukleotide, 10 µl 10 x dNTP „Labeling Mix“, 5 µl Klenow Enzym, 55 µl aqua pur hinzugefügt und o/n bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM EDTA gestoppt und überschüssige Nukleotide durch Fällung mit Ethanol und 44 µM LiCl entfernt. Das DNA-Pellet wurde 5 min an der Luft getrocknet, dann in 50 µl 1 x TE-Puffer (pH 8) gelöst und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Sonde wurde bei -20 °C gelagert.

2.8.6.2 Effizienzermittlung der DIG-Markierung

Zur Ermittlung der Markierungseffizienz wurden von der DNA-Sonde und einer Kontroll DNA Verdünnungsreihen in 1 x TE-Puffer (pH 8) (1:20 – 1:2.000.000) angefertigt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde jeweils 1 µl auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) gespottet und durch 30-minütiges Backen bei 120 °C fixiert. Die Detektion erfolgte nach einem verkürzten Detektionsprotokoll der Firma Roche. Die Signalintensität der Sonden-DNA wurde mit der Kontroll-DNA verglichen und die Konzentration der Sonden-DNA berechnet.

2.8.6.3 Southern-Blot

Das Agarosegel (0,8 %) wurde 5 min in 250 mM HCl unter leichtem Schütteln depuriniert, anschließend mit aqua pur gespült und 2 x für 15 min in Denaturierungslösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach kurzem Spülen mit aqua pur wurde das Gel 2 x für 15 min in Neutralisierungslösung unter leichtem Schütteln neutralisiert und anschließend mittels Kapillarblot (20 x SSC) die DNA o/n auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Die Fixierung der DNA erfolgte durch 30-minütiges Backen der Membran bei 120 °C.

2.8.6.4 DNA/DNA-Hybridisierung

Zuerst wurde eine Prähybridisierung durchgeführt. Dazu wurden 20 ml vorgewärmter (42 °C) Hybridisierungspuffer (DIG-Easy-Hyb, Roche) sterilfiltriert (Filterporenweite 0,45 µm, Whatman®, Schleicher & Schüll, Dassel) und zusammen mit der Membran in einem Hybridisierungsröhrchen bei 42 °C für 2 h in einem Hybridisierungssofen (OV3, Biometra, Göttingen) inkubiert.

Zur Hybridisierung wurde die Sonde für 10 min bei 100 °C gekocht, sofort im Eis/NaCl-Bad abgekühlt, die zuvor ermittelte Menge Sonde zusammen mit 10 ml vorgewärmten (42 °C) Hybridisierungspuffer zu der prähybridisierten Membran in das Hybridisierungsröhrchen gegeben und o/n bei 42 °C inkubiert.

2.8.6.5 Detektion

Die Membran wurde 2 x 5 min bei RT in Waschpuffer 1 unter kräftigem Schütteln gewaschen. Danach erfolgte eine stringente Waschung bei 68 °C in Waschpuffer 2 für 2 x 15 min. Anschließend wurde die Membran für 1 min bei RT in Tween Waschlösung äquilibriert und 1 h bei RT in Puffer 2 inkubiert (leichtes Schütteln). Es

folgte eine Inkubation mit Antikörpern (20 ml Puffer 2 und 2 µl Antidigoxigenin-AP, Roche) für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln. Danach wurde die Membran 2 x 15 min bei RT in Tween Waschlösung kräftig gewaschen und 5 min bei RT in Puffer 3 äquilibriert. Danach wurde die Membran in einer CSPD-Lösung (2 ml Puffer 3 + 20 µl CSPD) 5 min bei RT inkubiert, die Lösung entfernt und die Membran in Folie eingeschweißt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Membran zur Detektion des Signals je nach Intensität 0,5 – 13 h auf einen Röntgenfilm (Medical X-Ray Film, Fuji) gelegt.

2.8.7 PCR

2.8.7.1 *L. lactis* Phagen

Zum Nachweis und zur Spezies-Identifizierung der *L. lactis* Phagen wurden das von Labrie & Moineau (2000) etablierte Multiplex-PCR System verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in 50 µl Ansätzen durchgeführt mit 20 µl 2,5 x PCR-Mastermix (Fermentas, Deutschland), je 20 pmol Primer (MWG-Biotech) und 1 µl Template (Phagen-DNA, Phagen-Lysat).

Tabelle 2.5: Primer zum Nachweis und Identifizierung der *L. lactis* Phagen (Labrie & Moineau, 2000).

Primer	Sequenz (5' → 3')	PCR-Produktlänge (bp)
936A 936B	TCAATGGAAGACCAAGCGGA GTAGGAGACCAACCCAAGCC	179
c2A c2B	CAGGTGTAAAAGTTTCGAGAACT CAGATAATGCACCTGAATCA	474

Tabelle 2.6: Programm Multiplex-PCR *L. lactis* Phagen (Labrie & Moineau, 2000)

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
1	94 °C	5 min	35
2	94 °C	45 s	
	58 °C 74 °C	1 min 1 min	
3	74 °C	5 min	
4	4 °C	∞	

2.8.7.2 *S. thermophilus* Phagen

Zur Einteilung der *S. thermophilus* Phagen in *cos*- bzw. *pac*-Typ Phagen wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt. Die PCR-Reaktionen wurden in 50 µl Ansätzen durchgeführt mit 20 µl 2,5 x PCR-Mastermix (Fermentas, Deutschland), je 25 pmol Primer (MWG-Biotech) und 1 µl Template (Phagen-DNA, Phagen-Lysat).

Tabelle 2.7: Primer zur Einteilung der *S. thermophilus* Phagen in *cos*- bzw. *pac*-Typ Phagen (Ali *et al.*, 2006)

Primer	Sequenz (5' → 3')	PCR-Produktlänge (bp)
YP-1	GCTCGTCTTGAAGCTATGC	432
YP-2	GATAAG AGTCAAGTGACCGTC	
YC-1	GCTATG CTTGAC GATTCAGT	514
YC-2	AGCAGAATCAGCAAGCAAG	

Tabelle 2.8: Programm Multiplex-PCR *S. thermophilus* Phagen (Ali *et al.*, 2006)

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
1	94 °C	4 min	35
2	94	30 s	
	51,8 °C	30 s	
	72 °C	30 s	
3	72 °C	7 min	
4	4 °C	∞	

2.8.8 Pulsfeldgelelektrophorese

Zur Bestimmung der Genomgrößen der Phagen wurde die ungeschnittene Phagen DNA mittels PFGE aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in 1,1%iger Agarose (Typ II Agarose in 0,5 x TBE-Puffer). Es wurden 50 – 150 ng DNA aufgetragen und mit 0,8%iger Low-Melt Agarose (Bio-Rad, München) überschichtet. Der Lauf wurde über 16 – 18 h in 0,5 x TBE bei 14 °C, 175 V und einer Pulszeit von 2 s durchgeführt (Kammer: Chef-Electrophoresis-Cell, Bio-Rad, München).

2.9 Phagenmonitoring

Im Anhang (Tabelle 7.1) sind die verschiedenen Betriebe und die jeweilig zugehörigen Proben/Kulturen aufgelistet. Von den Kulturenherstellern wurden insgesamt neun *L. lactis*-, sieben *S. thermophilus*-, fünf *Ln. mesenteroides*- und drei *Lb. delbrueckii*-Phagen mit den jeweiligen Wirtstämmen zur Verfügung gestellt (Tabellen 2.1, 2.2, 2.3 und 2.4).

2.9.1 Probenaufbereitung

Zu den Schnittkäseproben (10 g) wurden 90 ml 2%ige Natrium-Citratlösung (45 °C) hinzugegeben und anschließend im Stomacher (Mix 1, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden) homogenisiert. Frischkäse- und Quarkproben wurden 1:2 mit ¼-starker Ringerlösung verdünnt. Molkenpulver (5 g) wurde in 10 ml ¼-starker Ringerlösung gelöst. Die Joghurt-, Frischkäse- und Quarkproben wurden zusätzlich mit 0,3 % Milchsäure (Endkonzentration) für 30 min nachgesäuert. Alle vorbehandelten Proben und die Molke-, Salzbad- und Milchproben wurden zentrifugiert (17.000 x g, 20 min, 4 °C) und für den Phagennachweis sterilfiltriert (Filterporenweite 0,45 µm, Whatman®, Schleicher & Schüll, Dassel). Zum Nachweis von Phagen in Reinigungslösungen wurde versucht, diese zuvor anzureichern. Dazu wurde die Gesamtkultur des jeweiligen Betriebes in Bouillon angezüchtet und davon 300 µl in 5 ml LM17-Bouillon überimpft. Nach 1 h Inkubation bei 30 °C (mesophile) bzw. 40 °C (thermophile) wurden 100 µl der jeweiligen Reinigungslösung und 100 µl 40 mM CaCl₂ hinzugegeben und o/n bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Danach wurde dieser Ansatz zentrifugiert (4.000 x g, 15 min, 4 °C), sterilfiltriert (Filterporenweite 0,45 µm, Whatman®, Schleicher & Schüll, Dassel) und für eine erneute Anreicherung eingesetzt. Insgesamt wurden drei dieser Anreicherungsschritte nacheinander durchgeführt, bevor der Ansatz für den Phagennachweis eingesetzt wurde.

2.9.2 Kulturenaufbereitung

Die zur Verfügung gestellten Starterkulturen wurden zunächst in Magermilch angezüchtet und anschließend auf LM17 Nährboden fraktioniert ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C (*L. lactis*) und bei 40 °C (*S. thermophilus*). Von jeder Kultur wurden 17 (*L. lactis*) oder fünf (*S. thermophilus*) Einzelkolonieisolate

hergestellt und in Lackmusmilch angezüchtet. Für den nachfolgenden Säuerungsaktivitätstest wurden die Isolate in Mikrotiterplatten inkubiert.

2.9.3 Säuerungsaktivitätstest

Für den Säuerungsaktivitätstest wurden Mikrotiterplatten mit Indikatormedium befüllt, mit den Isolaten und aufbereiteten, sterilfiltrierten Proben beimpft und o/n bei 30 °C (*L. lactis*) bzw. 40 °C (*S. thermophilus*) inkubiert. Isolate, die für eventuell vorhandene Phagen sensibel waren, konnten anhand der verzögerten oder ausbleibenden Säuerung identifiziert werden.

2.9.4 Bestimmung der Phagentiter in den Proben

Die Bestimmung der Phagentiter in den Proben erfolgte mit den zuvor im Säuerungsaktivitätstest ermittelten phagensensitiven Isolaten mittels Plaque- oder Spotttest.

2.10 Thermische Inaktivierung von Phagen

Für die thermische Inaktivierung wurden hochtitrige Phagensuspensionen (Magermilch, Wasser (aqua pur), Boullion) in Edelstahlröhrchen gefüllt (Volumen ca. 1,5 ml). Die Röhrchen wurden fest verschraubt und bis zur Erhitzung im Eisbad gekühlt. Es wurden jeweils zwei Röhrchen parallel im Wasserbad erhitzt. Das erste Röhrchen wurde nach 1 min entnommen und diente zur Ermittlung der Titerreduktion durch Aufheizung des Röhrchens. Das zweite Röhrchen wurde nach einer weiteren Minute entnommen und diente zur Ermittlung der Titerreduktion nach 1 min Erhitzung. Die Röhrchen wurden nach der Entnahme aus dem Wasserbad sofort im Eisbad gekühlt und der Titer an noch aktiven Phagen mittels Plaquetest bestimmt. Waren nach der Erhitzung noch aktive Phagen nachweisbar, wurde die Temperatur in 5 °C-Schritten erhöht und die thermische Inaktivierung mit unerhitzter Phagensuspension wiederholt.

2.11 Stressfaktoren

2.11.1 Erhöhter Salzgehalt

Zur Überprüfung des Einflusses eines erhöhten Salzgehaltes auf die Hitzestabilität von Phagen wurden phagenhaltige Salzbadproben über 200 Tage bei RT gelagert. Die Salzbadproben stammten aus dem Phagenmonitoring und enthielten ursprünglich Phagen. Der Phagentiter wurde nach 90 und 200 Tagen in den Proben mittels Plaquetest bestimmt und nach 200 Tagen die entsprechenden Phagen durch Einzelplaqueisolation isoliert. Die Daten über die thermische Inaktivierung der Phagen vor der Lagerung wurden von Müller-Merbach & Hinrichs (2006) erarbeitet. Zur Isolierung der Phagen aus den Salzbadproben und zur Überprüfung der Phagentiter dienten Indikatorstämme, wie sie auch schon beim vorhergehenden Phagenmonitoring und in der oben genannten Studie verwendet wurden (Tabelle 3.12).

2.11.2 Trockenheit

Um zu überprüfen, ob ein wiederholtes Eintrocknen und Resuspendieren von phagenhaltigen Milchproben zu einer erhöhten Thermoresistenz von Phagen führt, wurden vier repräsentative *L. lactis* Phagen mit unterschiedlicher Hitzestabilität in definiertem Titer in Magermilch resuspendiert und 1,5 ml dieser Suspension in Glaspetrischalen (Innendurchmesser 5 cm) über 48 h bei 40 °C eingetrocknet. Anschließend wurde die getrocknete Suspension in 1,5 ml aqua pur resuspendiert. Daraus wurden 100 µl für die erneute Vermehrung der Phagen in Bouillon verwendet. Die so vermehrten Phagen wurden erneut in Magermilch suspendiert und für einen weiteren Trocknungszyklus eingesetzt. Insgesamt wurden zehn Trocknungszyklen durchgeführt. Nach dem 3., 6. und 10. Trocknungszyklus wurde die Hitzestabilität der Phagen im Suspensionsmedium Magermilch wie oben beschrieben überprüft.

2.11.3 Hitze

Der Einfluss einer wiederholten Erhitzung auf die Hitzeresistenz des *L. lactis* Phagen P001 (Typphage der c2-Spezies) wurde mit folgendem Verfahren überprüft: Der Phage wurde hochtitrig (ca. 10^8 PbE/ml) in aqua pur verdünnt und für 1 min bei 68 – 69 °C im Wasserbad erhitzt, so dass eine Titerreduktion von 2,0 – 2,7 log-Stufen

erfolgte. Von dieser erhitzten Phagensuspension wurden 100 µl entnommen, die noch intakten Phagen in Bouillon vermehrt, erneut in aqua pur suspendiert und für einen weiteren Erhitzungszyklus eingesetzt. Parallel dazu wurde der Phage P001 als Kontrolle mitgeführt, nicht erhitzt, aber in der gleichen Anzahl von Durchgängen weitervermehrt/angezüchtet wie der „Test-Phage“ (Tabelle 2.9). Insgesamt wurden zehn Erhitzungszyklen durchgeführt.

Tabelle 2.9: Übersicht der P001 Hitzestressphagen

P001	unbehandelter Phage
P001 ^h	Phage P001 nach 10 Hitzezyklen
P001 ^k	P001-„Kontrollphage“ nach 10 Zyklen (nicht erhitzt)

2.12 Phagen mit unterschiedlicher spezifischer Dichte

Hertel *et al.* zeigten 1962, dass T5 Phagen mit einer geringeren spezifischen Dichte als der Wildtyp eine höhere Hitzeresistenz aufweisen. Um dies auch für *L. lactis* Phagen zu überprüfen, wurde der Phage P008 (Typphage der 936-Spezies) über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt und Derivate mit geringerer spezifischer Dichte isoliert. Dazu wurde der CsCl-Gradient in insgesamt 50 Fraktionen (ca. 300 µl) ausgetropft und der Phagentiter sowie der Brechungsindex (Abbé Refraktometer, Carl Zeiss) in diesen Fraktionen bestimmt. Anhand des Brechungsindex (n) wurde mit Formel (1) (Ifft *et al.*, 1970) die Dichte (p) der CsCl-Fraktionen berechnet.

$$p = 1,1584 - 10,2219 * n + 7,5806 * n^2 \quad (1)$$

Die Fraktion mit dem höchsten Phagentiter wurde als Hauptphagenbande gewählt und deren Dichte bestimmt. Aus einer Fraktion mit geringerer Dichte wurden die Phagen vermehrt und erneut über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und der Gradient wie oben beschrieben fraktioniert. Bei diesem zweiten Gradienten

wurden die Phagen aus der Fraktion mit der höchsten Phagenkonzentration weiter vermehrt und über einen dritten CsCl-Dichtegradienten aufgereinigt und fraktioniert. Die Hitzestabilität der Phagen aus der Hauptphagenbande des ersten Gradienten wurde mit der Hauptphagenbande des dritten Gradienten verglichen.

2.13 Phagen Strukturprotein-Analyse

2.13.1 Präparation der Phagen-Strukturproteine

100 µl CsCl-gereinigtes Phagenlysats wurde auf eine Nitrocellulose-Membran gespottet (Filterporenweite 0,025 µm, Millipore Corporation, Billerica, USA) und für 1 h gegen aqua pur dialysiert. Das dialysierte Phagenlysats wurde 4:1 mit SDS-Probenpuffer (incl. 100 mM DTT, Fermentas, Deutschland) versetzt, gemischt und 5 – 10 min gekocht. Danach wurde die Probe sofort auf Eis gekühlt und kurz abzentrifugiert.

2.13.2 SDS-PAGE

Die Phagenproteine wurden mit einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid Gel getrennt (Sammelgel 5 %, Trenngel 12 %), (Sambrook & Russel, 2001). Das Gel wurde in einem Gießstand der Firma Hoefer gegossen. Der Gellauf erfolgte in einer Kammer der Firma Hoefer (Modell SE260), bis zum Ende des Trenngels bei 15 mA. Danach wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel o/n in Coomassieblue Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde das gefärbte Gel in aqua pur gewaschen und für ca. 1 h in der Entfärbelösung entfärbt. Das entfärbte Gel wurde in Folie eingeschweißt und zur weiteren Dokumentation eingescannt.

2.14 Transmissions-Elektronenmikroskopie

2.14.1 Probenvorbereitung für die Transmissions-Elektronenmikroskopie

Reine Kohle wurde auf frisch gespaltene Glasglimmerplatten (Plano, Wetzlar) aufgedampft (Bedampfungsanlage MED20, Balzers, Lichtenstein) und von diesen Platten mit einem Skalpell kleine Quadrate (ca. 3 x 3 mm) abgeschnitten. Der Kohlefilm wurde in 100 µl Phagenlysats abgeschwemmt, und nach einer 10-minütigen Adsorptionszeit in zwei Tropfen aqua pur gewaschen. Der Kohlefilm wurde anschließend in 2%iger Uranylacetat-Lösung (Agar Scientific, Stansted, UK)

überführt und nach wenigen Sekunden auf ein 400-mesh Kupfernetzchen (3 mm Durchmesser, Agar Scientific, Stansted, UK) übertragen. Überschüssiges Uranylacetat wurde mit einem Filterpapier abgezogen.

2.14.2 Elektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie erfolgte an einem Tecnai 10 (Fei Company, Eindhoven, NL) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 KV. Die Aufnahmen wurden mit einer CCD-Kamera (Megaview II; SIS, Münster) bei einer Primärvergrößerung von bis zu 210.000x angefertigt. Die Bildanalyse erfolgte mit der analySIS Docu 3.2 Software (Soft Imaging SIS, Münster).

3 Ergebnisse

3.2 Phagenmonitoring

Um den aktuellen Phagenstatus in deutschen Molkereien erfassen zu können, wurde ein umfangreiches Phagenmonitoring durchgeführt. Dies bot die Möglichkeit des Vergleichs von Großunternehmen und kleinen und mittleren Unternehmen (KMU) hinsichtlich Phagenvorkommen und vor allem auch der Hitzestabilität der neu isolierten Phagen.

3.2.1 Phagennachweis in den Proben

Hinsichtlich ihrer Phagenbelastung unterschieden sich Proben der Großunternehmen von denen der KMU erheblich. Während nur bei fünf der elf Großunternehmen phagenhaltige Proben nachgewiesen wurden, wurden in Proben aller beteiligten KMU Phagen dokumentiert. In Tabelle 3.1 ist die Phagenbelastung der untersuchten Proben und deren Zuordnung zu den Unternehmensformen zusammengefasst. Am häufigsten waren die Molke-, Salzbad- und Käseproben mit Phagen belastet. In sämtlichen Salzbadproben wurden sowohl bei den Großbetrieben als auch bei den KMU Phagen nachgewiesen. In den Reinigungslösungen, Milch- und Molkepulverproben konnten keine Phagen nachgewiesen werden. Es wurden sehr unterschiedliche Phagentiter sowohl bei den Großbetrieben als auch bei den KMU dokumentiert (Tabelle 3.2 und 3.3).

Tabelle 3.1: Anzahl der phagenhaltigen Proben im Phagenmonitoring

Proben	Großbetriebe	KMU
Molke	10 (von 16)	7 (von 9)
Salzbad	2 (von 2)	13 (von 13)
Frischkäse	0 (von 2)	2 (von 3)
Joghurt	1 (von 14)	1 (von 3)
Käse	1 (von 3)	2 (von 2)
Milch	0 (von 1)	0 (von 1)
Quark	-	2 (von 2)
Molkenpulver	0 (von 1)	-
Reinigungslösungen	0 (von 18)	0 (von 2)

Tabelle 3.2: Übersicht der Titer der *L. lactis* Phagen in den Proben der Großbetriebe, [PbE/ml].

Betrieb	Molke	Salzbad	Frischkäse	Joghurt	Käse	Milch	Quark	Molkenpulver	Reinigungslösungen
Betrieb 1	n.n.	-	n.n.	n.n.	-	-	-	-	-
Betrieb 2	5×10^2 5×10^4 (a)	-	-	-	5×10^6 5×10^5 (a)	-	-	-	n.n.
Betrieb 3	n.n.	6×10^6	-	n.n.	-	-	-	n.n.	n.n.
Betrieb 4	n.n.	-	-	-	-	-	-	-	-
Betrieb 9	n.n.	-	n.n.	9×10^5 (a)	-	-	-	-	n.n.
Betrieb 11	$2 \times 10^4 - 3 \times 10^8$	8×10^7				n.n.		-	n.n.
Betrieb 13	-	-	-	n.n.	-	-	-	-	-
Betrieb 14	-	-	-	-	-	-	2×10^8	-	-
Betrieb 16	n.n.	-	-	-	-	-	-	-	-
Betrieb 26	-	-	-	-	-	-	-	-	n.n.
Betrieb 30	-	-	-	-	-	-	-	-	n.n.

(a): Titer *S. thermophilus* Phagen

n.n.: nicht nachweisbar

-: keine Proben verfügbar

Tabelle 3.3: Übersicht der Titer der *L. lactis* Phagen in den Proben der KMU, [PbE/ml].

Betrieb	Molke	Salzbad	Frischkäse	Joghurt	Käse	Milch	Quark	Molkenpulver	Reinigungslösungen
Betrieb 5	5×10^3	$8 \times 10^5 - 1 \times 10^6$	n.n.	n.n.	-	-	-	-	-
Betrieb 6	-	-	$4 \times 10^8 - 8 \times 10^8$	-	-	-	-	-	-
Betrieb 7	1×10^3	2×10^7	-	-	3×10^4	-	-	-	n.n.
Betrieb 8	4×10^4	3×10^5	-	-	-	-	7×10^5	-	-
Betrieb 10	$1 \times 10^4 - 2 \times 10^7$	-	-	n.n.	-	-	-	-	-
Betrieb 12	4×10^8	2×10^7	-	-	2×10^9	-	-	-	-
Betrieb 15	2×10^6	$3 \times 10^3 - 3 \times 10^8$	-	-	-	n.n.	-	-	-
Betrieb 17	-	-	-	4×10^2	-	-	1×10^9	-	-

n.n.: nicht nachweisbar

-: keine Proben verfügbar

3.2.2 Elektronenoptische Charakterisierung der Phagenisolate

Zur Überprüfung der Diversität der im Phagenmonitoring isolierten Phagen wurden elektronenoptische Analysen der Isolate durchgeführt. Die Abbildungen 3.1 und 3.2 zeigen exemplarisch die Morphologien der in den verschiedenen Betrieben nachgewiesenen Phagen.

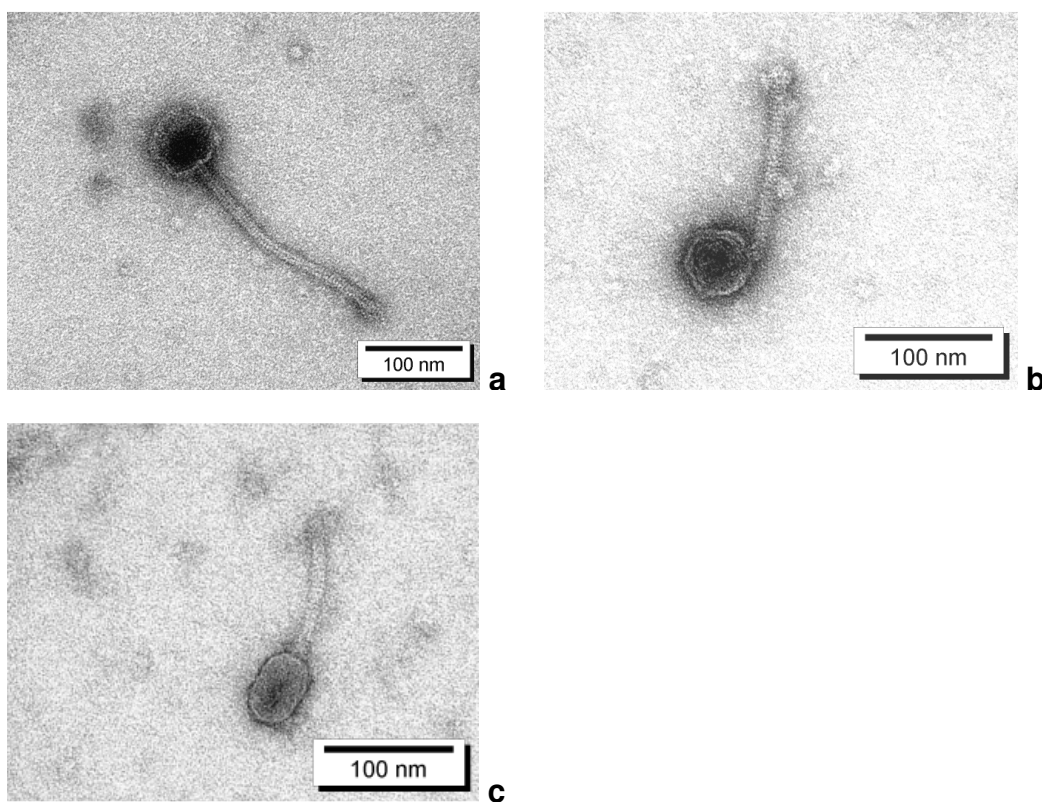


Abbildung 3.1: Elektronenoptische Aufnahmen der Phagen der Großbetriebe. (a) *S. thermophilus* Phage P619, (b) *L. lactis* Phage P622, (c) *L. lactis* Phage P653

Die Mehrzahl der Phagenisolate, sowohl in Großbetrieben, als auch KMU, ließ sich den isodiametrischen *L. lactis* Phagen mit einer Schwanzlänge von ca. 160 nm zuordnen. Anhand des in Abbildung 1.1 gezeigten Klassifizierungsschemas gehören diese Phagen zur 936-Spezies. Ebenso wurden in beiden Betriebsformen prolate *L. lactis* Phagen der c2-Spezies dokumentiert. In einem KMU wurden isodiametrische *L. lactis* Phagen (Abbildung 3.2, Phage P644) mit kurzen Schwänzen (130 nm) nachgewiesen. Diese sind der P335-[r1t]-Spezies zuzuordnen. Der

isodiametrische *L. lactis* Phage P682 (Abbildung 3.2) ließ sich mit einer Schwanzlänge von 210 nm (± 6 nm, $n = 6$) nicht eindeutig einer Phagenspezies zuordnen. *S. thermophilus* Phagen konnten nur in 2 Großbetrieben nachgewiesen werden und zeigten morphologisch ein einheitliches Bild (isodiametrischer Kopf, Schwanzlänge 240 nm).

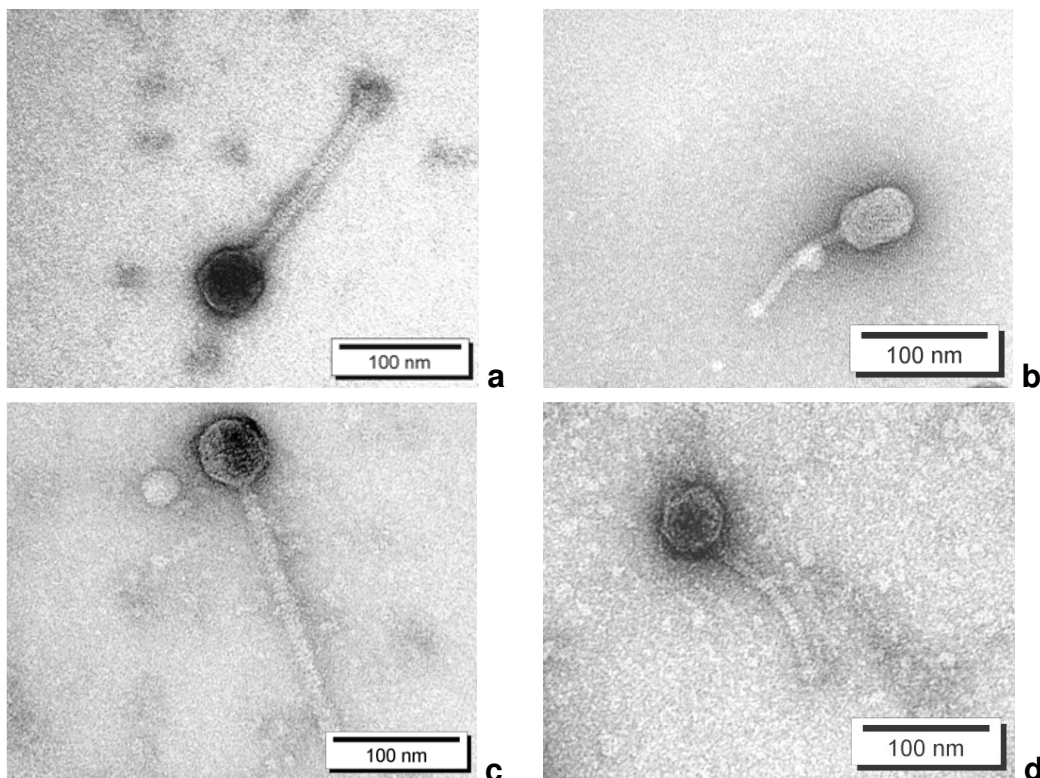


Abbildung 3.2: Elektronenoptische Aufnahmen der Phagen der KMU. (a) *L. lactis* Phage P623, (b) *L. lactis* Phage P624, (c) *L. lactis* Phage P682, (d) *L. lactis* Phage P644

Die von den am Phagenmonitoring teilnehmenden Kulturenherstellern bereitgestellten *L. lactis* Phagenisolate wurden ebenfalls in die TEM-Untersuchung einbezogen (Abbildungen 3.3 - 3.6). Dabei wurden Phagen der weit verbreiteten 936- und c2-Spezies dokumentiert (Abbildungen 3.3 und 3.4). Ebenso wurden Phagen der seltenen isodiametrischen 949- und P335-[BK5-T]-Spezies (Schwanzlängen 500 bzw. 250 nm) nachgewiesen (Abbildung 3.4).

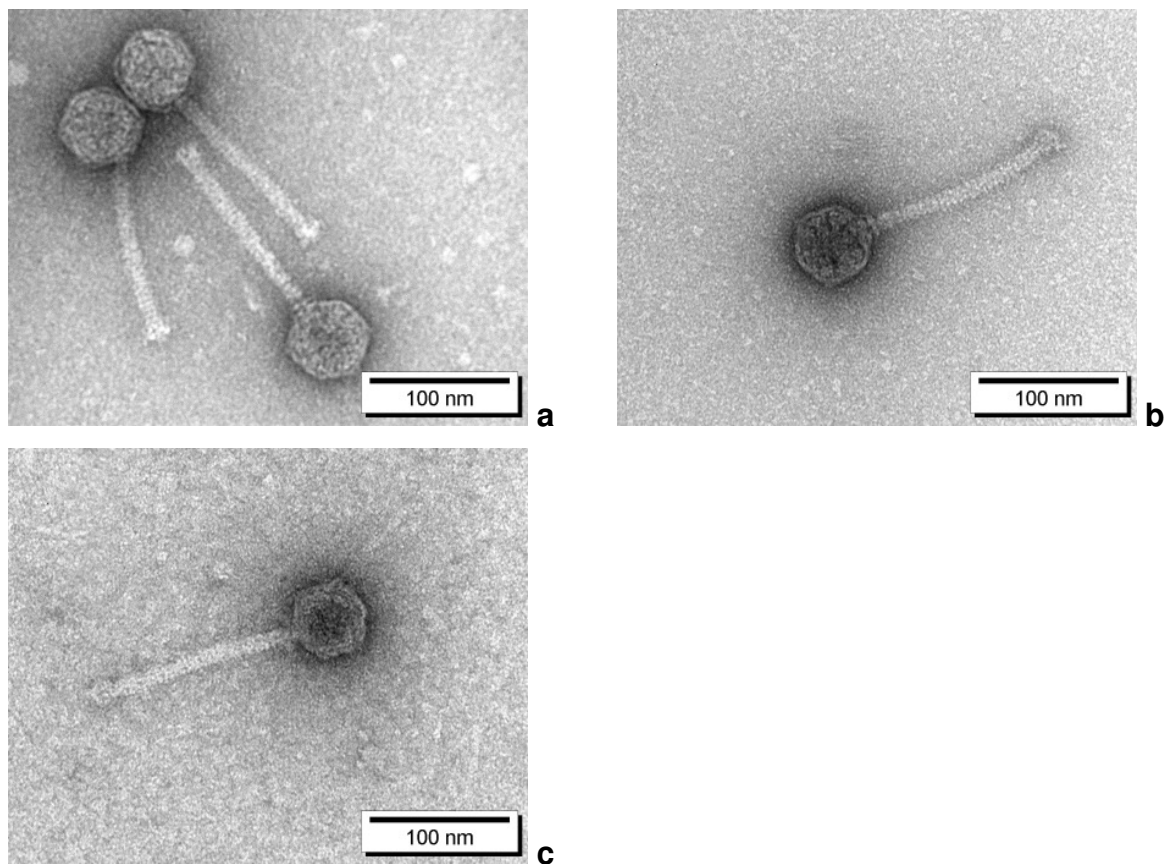


Abbildung 3.3: Elektronenoptische Aufnahmen der *L. lactis* Phagen (a) P1532, (b) P1569, (c) P4565.

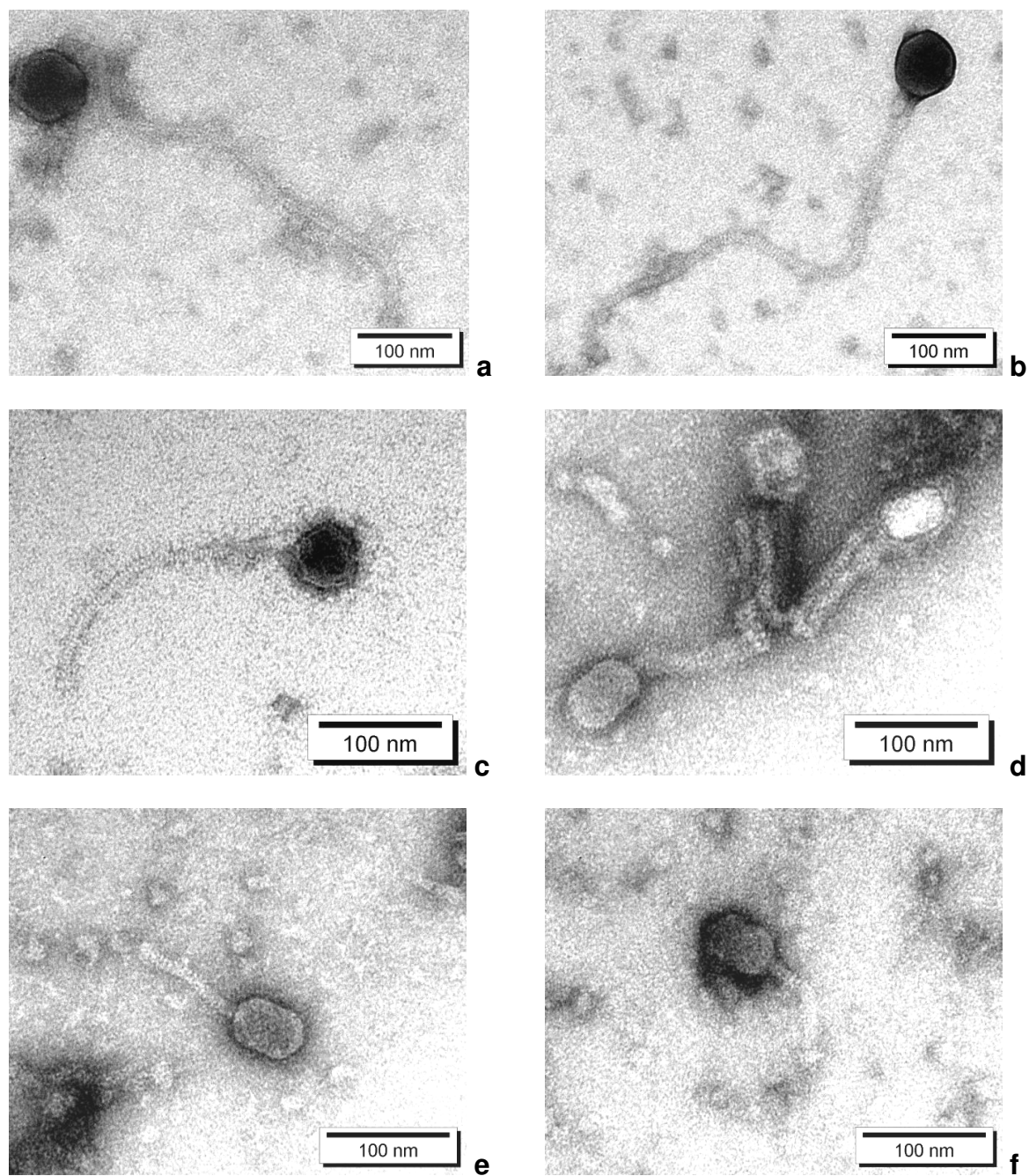


Abbildung 3.4: Elektronenoptische Aufnahmen der *L. lactis* Phagen (a) CHPC21, (b) CHPC310, (c) CHPC412, (d) CHPC204, (e) CHPC364, (f) CHPC649.

Die *Ln. mesenteroides* Phagen zeigten in der TEM-Analyse ein einheitliches Bild, mit isodiametrischem Kopf und nicht-kontraktilem Schwanz (130 – 140 nm) (Abbildung 3.5). Der *Lb. delbrueckii* subs. *bulgaricus* Phage CHPC658 (Abbildung 3.6) lies sich zu den isodiametrischen Phagen mit nicht-kontraktilem Schwanz (163 ± 5 nm, $n = 3$) zuordnen.

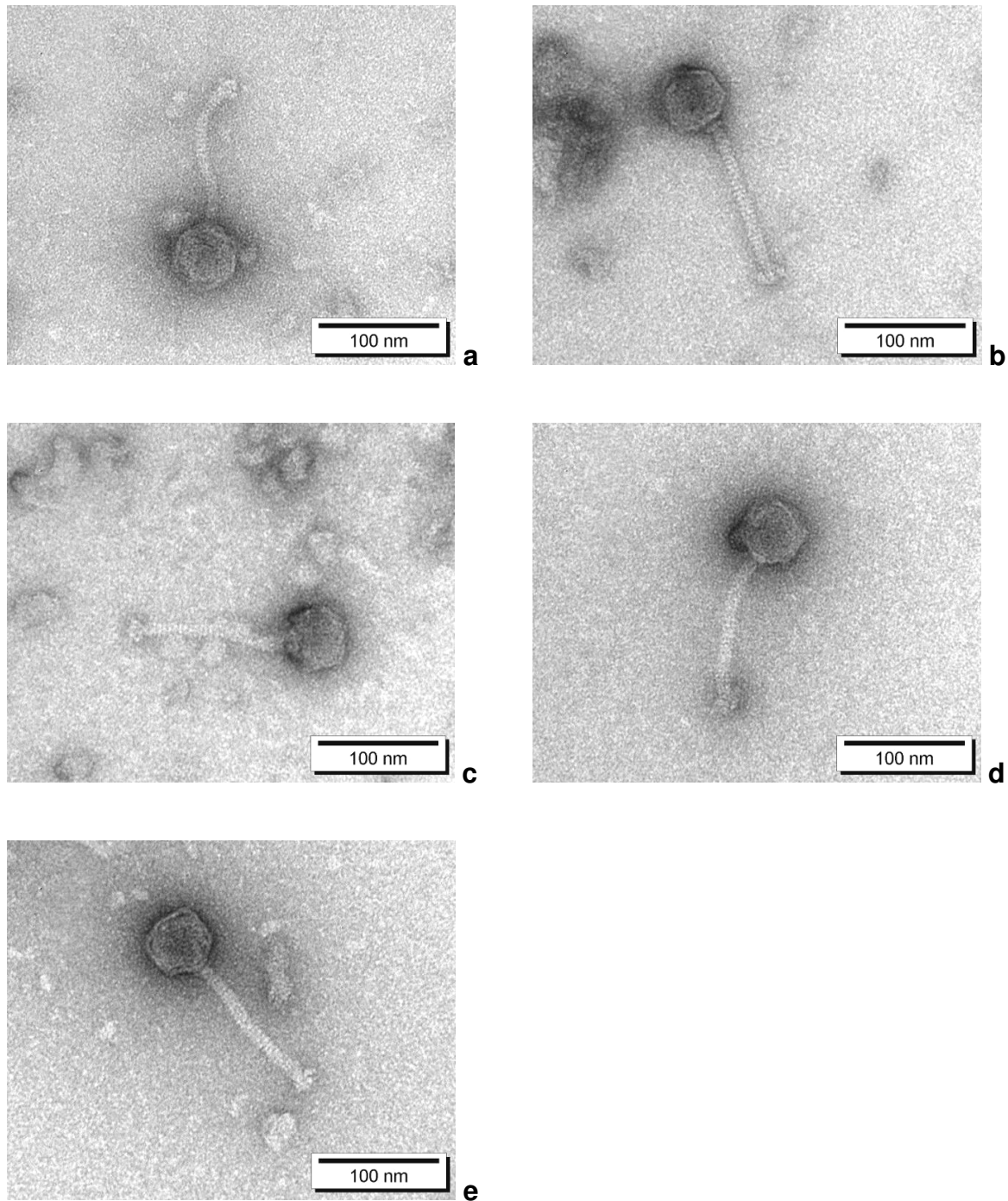


Abbildung 3.5: Elektronenoptische Aufnahmen der *Ln. mesenteroides* Phagen (a) P728, (b) P1594, (c) P1599, (d) P958, (e) P4556.

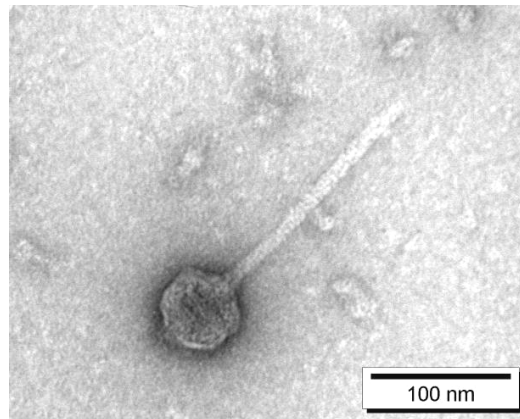


Abbildung 3.6: Elektronenoptische Aufnahme des *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Phagen CHPC658.

3.2.3 Molekularbiologische Charakterisierung der Phagenisolate

3.2.3.1 *L. lactis* Phagen

PCR-Differenzierung

Die Klassifizierung der *L. lactis* Phagen anhand der Morphologie ist nicht immer eindeutig, da sich die isodiametrischen Phagen teilweise nur durch eine Schwanzlängendifferenz von 20 nm unterscheiden. Um die Ergebnisse der TEM-Analyse zu bestätigen und um die Phagen eindeutig einer Spezies zuzuordnen, wurde die Spezieszugehörigkeit mittels PCR mit spezifischen Primern für die c2- und 936-Phagenspezies überprüft (Labrie & Moineau, 2000). Die PCR-Amplifikate beider Phagenspezies unterscheiden sich in der Größe, so dass die Differenzierung der 936-Phagen (Amplifikat: 179 bp) und der c2-Phagen (Amplifikat: 474 bp) auch in Multiplex-PCR-Ansätzen möglich ist. Die Abbildung 3.7 zeigt die Identifizierung von vier 936- und sechs c2-Phagen. Die Ergebnisse der PCR-Versuche sind in der Tabelle 3.4 für alle Phagen aus den Betrieben des Phagenmonitorings zusammengestellt. Insgesamt ließen sich 47 der untersuchten 58 Betriebsphagen der 936-Phagenspezies und 9 Phagen der c2-Phagenspezies zuordnen.

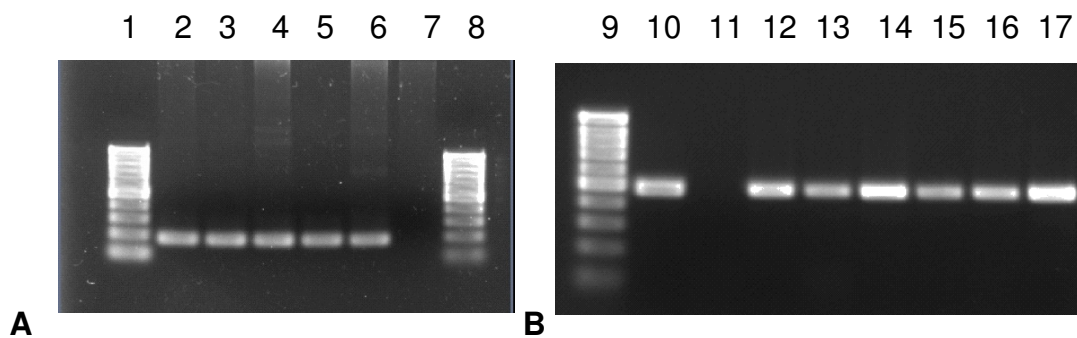


Abbildung 3.7: Agarosegel (1,5 %) der PCR-Amplifikate von *L. lactis* Phagen. Verwendet wurden die PCR-Primer für die 936- (A) und c2-Phagen-Spezies (B). Als Kontrollen wurden die Phagen P008 (936-Spezies; Bahn 2 & 11), P001 (c2-Spezies; Bahn 10) und r1t (P335-Spezies, Bahn 7) verwendet. Die Phagen P1532 (3), P1569 (4), P627 (5) und P629 (6) wurden als 936-Phagen identifiziert (Abbildung 3.8). Die Phagen P624 (12), P625 (13), P635 (14), P636 (15), P638 (16), P653 (17) wurden der c2-Phagenspezies zugeordnet. Die Bahnen 1, 8 & 9 zeigen den Größenstandard (100-bp DNA Ladder AppliChem, Darmstadt).

DNA/DNA-Hybridisierungen

Die *L. lactis* Phagen der P335-Phagenspezies stellen eine genetisch sehr heterogene Phagenspezies dar, für die eine universale konservierte DNA-Region als PCR-Zielregion nicht existiert. Daher wurden die DNAs der Referenzphagen r1t (P335-Spezies), P008 (936-Spezies) und P001 (c2-Spezies, Negativkontrolle) in DNA/DNA-Hybridisierungsversuchen (Dot-Blot und Southern-Blot) verwendet, um die Ergebnisse der PCR-Analysen abzusichern und um r1t-ähnliche P335-Phagen zu identifizieren. Die Abbildung 3.8 und Tabelle 3.4 zeigen, dass für die 936- und für die c2-Phagen die PCR-basierte Spezieszuordnung bestätigt wurde. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Phagenisolate aus dem Betrieb 17 (P643 und P644), die kein Produkt mit den c2- und 936-spezifischen Primern ergaben, mit dem r1t-Referenzphagen verwandt sind (Abbildung 3.9). Die Abbildung 3.10 zeigt, dass die in den Erhitzungsversuchen verwendeten Phagen P204 und P566 aus der Instituts-Phagensammlung auch r1t-verwandte Phagen darstellen. Die in der Abbildung 3.10 gezeigte Southern-Blot-Analyse dokumentiert, dass der *L. lactis* Phage P680 nicht den r1t-Phagen zugerechnet werden kann, sondern ein Vertreter der 936-Phagenspezies darstellt (Abbildung 3.8 und Abbildung 3.10).

Tabelle 3.4: Spezieszuordnung der *L. lactis* Phagen in den Betrieben des Phagenmonitorings

Spezies-Zuordnung durch:

Unternehmen	Phagen ¹	PCR	DNA/DNA-Hybridisierungen
Großbetriebe			
Betrieb 2	<u>P620</u> , P622	936	936
Betrieb 3	<u>P653</u> , <u>P654</u> , <u>P655</u>	c2	
Betrieb 11	<u>P635</u> , P636, P638	c2	c2
	<u>P637</u> , P645, P646, P647, <u>P648</u> , P649, P650, <u>P651</u> , <u>P652</u>	936	936
Betrieb14	<u>P618</u>	936	936
KMU			
Betrieb 5	<u>P623</u> , <u>P685</u>	936	936
	<u>P684</u>	c2	c2
Betrieb 6	P624, P625	c2	c2
Betrieb 7	<u>P626</u> , <u>P627</u> , <u>P628</u> , P681	936	936
Betrieb 8	<u>P629</u> , <u>P630</u> , <u>P683</u> , <u>P682</u>	936	936
Betrieb 10	P632, <u>P633</u> , P634	936	936
Betrieb 12	<u>P639</u> , P640 ² , P641	936	936
Betrieb 15	<u>P642</u> , <u>P656</u> , P657, P658, <u>P659</u> , <u>P660</u> , P661, P662, P663, P664, P665, <u>P666</u> , P667, P668, P669, P670, <u>P671</u> , P672, <u>P673</u>	936	936
Betrieb 17	<u>P643</u> , <u>P644</u>	-	P335

¹ Für die unterstrichenen Phagen wurde die Spezies mittels DNA/DNA-Hybridisierung überprüft.² Keine PCR durchgeführt.

- : 936- und c2-spezifische PCR negativ

										P008	P620	P623	P630	P639	P656	P660	P666	P682
										P685	P4565							
										r1t	P618	P626	P629	P633	P637	P642	P643	P644
										P648	P651	P659	P673	P680	P1532	P1569	P652	
										P001	P624	P635	P684					

Abbildung 3.8: DNA/DNA-Hybridisierung (Dot-Blot) von intakter DNA ausgewählter *L. lactis* Phagen mit einer DNA-Sonde (Digoxigenin-markiert) des Referenzphagen P008 (936-Phagenspezies). Als Negativkontrollen wurden die DNAs der Phagen P001, P624, P635, P684 (c2-Spezies, links untere Reihe) und r1t (P335-Spezies, links mittlere Reihe) eingesetzt.

			P008	P628	P629
			r1t	P643	P644
			P001	P684	

Abbildung 3.9: DNA/DNA-Hybridisierung (Dot-Blot) von intakter DNA ausgewählter *L. lactis* Phagen mit einer DNA-Sonde (Digoxigenin-markiert) des Referenzphagen r1t (P335-Spezies). Als Negativkontrollen wurden die DNAs der Phagen P008, P628, P629 (936-Spezies, links obere Reihe), P001 und P684 (c2-Spezies, links untere Reihe) eingesetzt.

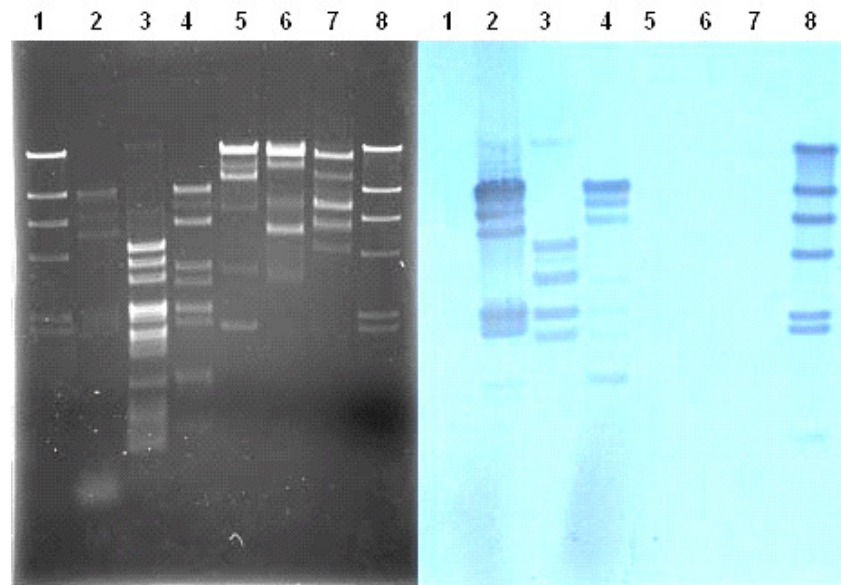


Abbildung 3.10: DNA/DNA-Hybridisierung (Southern-Blot) der Phagen P204 (Bahn 3), P566 (4), P1532 (5), P1569 (6) und P680 (7) mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde des Referenzphagen r1t (P335-Spezies; Bahn 2). Als Größenreferenz wurde DNA des Phagen Lambda (unmarkiert: Bahn 1, Digoxigenin-markiert: Bahn 8) verwendet. Alle DNAs wurden mit HindIII geschnitten.

3.2.3.2 Charakterisierung der hitzeresistenten *L. lactis* Phagen P1532 und P680

Die hitzeresistenten *L. lactis* Phagen P1532 und P680 (Abbildung 3.11) konnten durch PCR und DNA/DNA-Hybridisierung der 936 Spezies zugeordnet werden. Da sich der Typphage dieser Spezies (P008) jedoch als deutlich hitzesensibler herausgestellt hatte, sollte geprüft werden, ob auf genomischer Ebene Unterschiede zu den hitzestabilen Phagen auszumachen sind und dadurch Rückschlüsse auf den Mechanismus der Hitzestabilität gezogen werden können.

Um zu überprüfen, ob sich die Genombereiche des Phagen P008, die für die Strukturproteine kodieren, von denen des Phagen P680 unterscheiden, wurden DNA/DNA-Hybridisierungen mit einer P680-DNA-Sonde durchgeführt. Abbildung 3.12 zeigt, dass die DNA des Phagen P680 gut mit der des Phagen P008 hybridisierte. In der Tabelle 3.5 sind die Strukturproteingene des Phagen P008 zusammengestellt. Die Gene umfassen einen ca. 12 kb umfassenden Abschnitt auf der P008-Genomkarte (Bereich von 2.688 – 14.913 bp) (Mahony *et al.*, 2006).

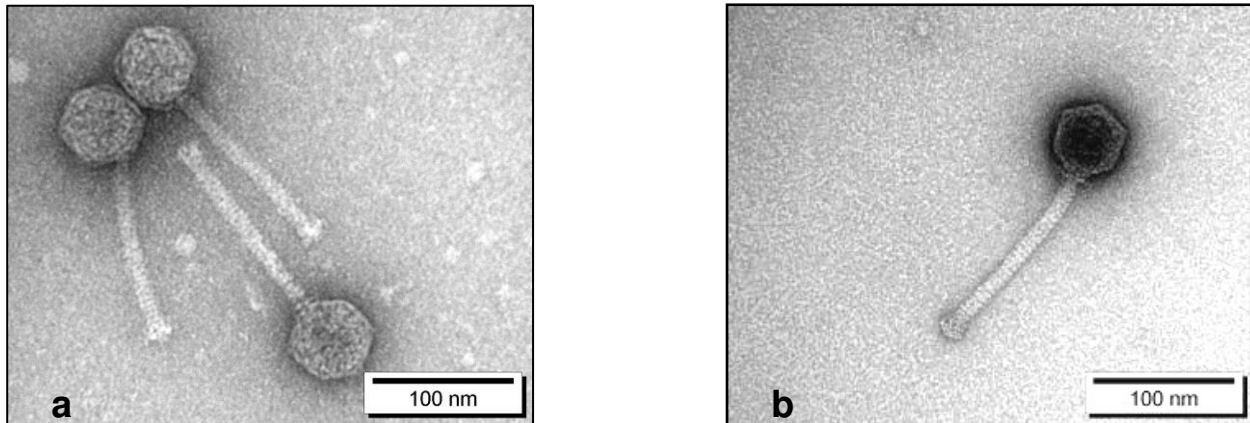


Abbildung 3.11: Elektronenoptische Darstellung der hitzeresistenten Referenzphagen P1532 (a) und P680 (b).

Tabelle 3.5: Beschreibung der Orfs der Strukturproteine des *L. lactis* Phagen P008 (Mahony *et al.*, 2006)

	Sequenzbereich	abgeleitete Funktion
<i>orf 4</i>	2.688-3.824	„Portal“ Protein
<i>orf 6</i>	4.334-5.515	Strukturprotein
<i>orf 7</i>	4.559-5.515	Strukturprotein
<i>orf 8</i>	5.536-5.799	Strukturprotein
<i>orf 9</i>	5.799-6.113	Strukturprotein
<i>orf 10</i>	6.110-6.451	Strukturprotein
<i>orf 11</i>	6.442-6.807	Hauptschwanzprotein
<i>orf 12</i>	6.836-7.273	Kragenprotein
<i>orf 13</i>	7.297-8.202	Kopfprotein
<i>orf 16</i>	9.064-11.814	„Tape measure“ Protein
<i>orf 20</i>	14.110-14.913	Rezeptorbindeprotein

Um die Genomabschnitte, die für die Strukturproteine kodieren, differenzieren zu können, wurde die DNA des Phagen P008 mit den Enzymen NcoI und NsiI verdaut, und so in vier klar unterscheidbare Fragmente (Tabelle 3.6) geteilt. Hierbei umfasste Fragment 4 dieses Verdau die Orfs 6 bis 12 des Morphogenese-Moduls.

In der Hybridisierung zeigte das NcoI/NsiI-Fragment 4 ein deutliches Signal mit der P680 Sonde, das Fragment 1 dieses Verdau hybridisierte hingegen nur schwach (Abbildung 3.12). Auf diesem Fragment sind Gene des Replikationsmoduls lokalisiert (Mahony *et al.*, 2006).

Tabelle 3.6: NcoI/NsiI-Fragmente der *L. lactis* P008 Phagen DNA

Fragmente	Sequenzbereich
1	15.696-28.538
2	7.486-15.695
3	1-4.246
4	4.247-7.485

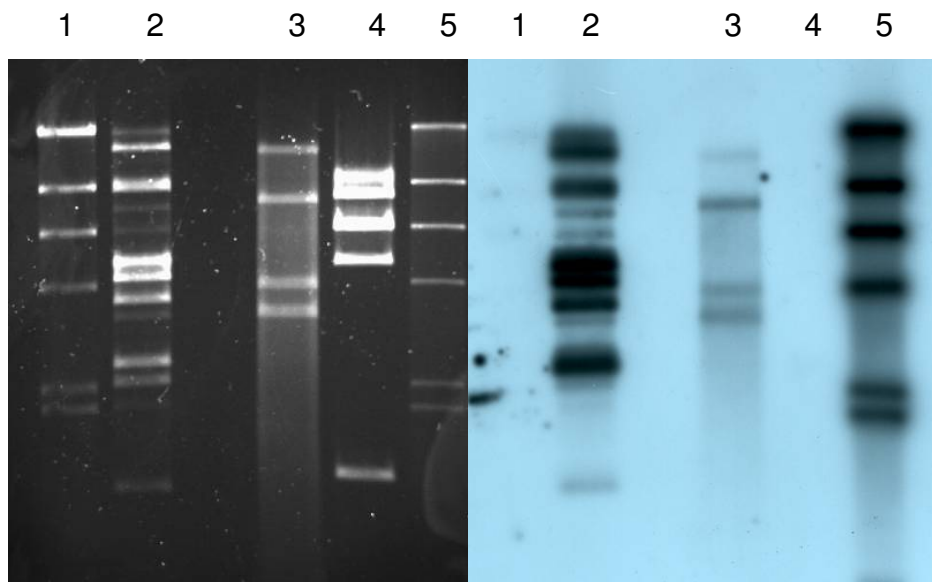


Abbildung 3.12: DNA/DNA-Hybridisierung (Southern-Blot) der Phagen P008 (Bahn 3) und P001 (4) mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde des hitzeresistenten Phagen P680 (2). Als Größenreferenz wurde DNA des Phagen Lambda (unmarkiert: Bahn 1, Digoxigenin-markiert: Bahn 5) verwendet. Die DNA des Phagen P008 wurde mit den Enzymen NsiI und NcoI geschnitten, alle anderen DNAs mit EcoRV.

3.2.3.3 Bestimmung der Genomorganisation der hitzestabilen Phagen P1532 und P680

Um zu überprüfen, ob die DNA der hitzestabilen *L. lactis* Phagen kohäsive (*cos*) Enden aufweist, wurde die DNA der beiden Phagen mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut, der Ansatz erhitzt und mit der unerhitzten Kontrolle auf das Vorhandensein von zusätzlichen Fragmenten verglichen. Abbildung 3.13 zeigt, dass die erhitzten Restriktionsansätze der DNAs der Phagen P1532 (EcoRV) und P680 (HindIII) zusätzliche Fragmente aufwiesen und somit das Vorhandensein von kohäsiven Enden bestätigen. Zusätzlich wurde dieser Versuch mit ligierter DNA der beiden Phagen durchgeführt, und hierbei waren nach Erhitzung des Restriktionsansatzes keine zusätzlichen Fragmente in der Gelelektrophorese erkennbar (Abbildung 3.14).

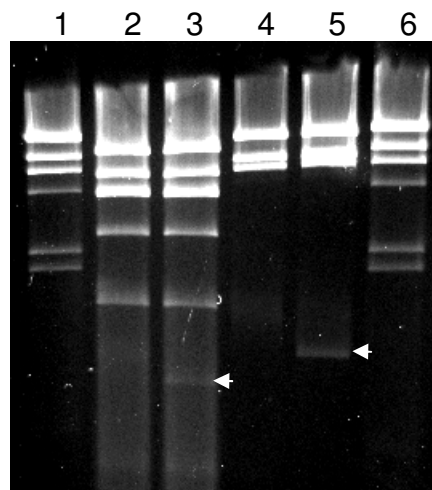


Abbildung 3.13: Agarosegel (1,5 %) zur Bestimmung der Genomorganisation durch Erhitzung der Restriktionsansätze der DNAs der *L. lactis* Phagen P1532 (Bahn 2 unerhitzt, Bahn 3 erhitzt) und P680 (Bahn 4 unerhitzt, Bahn 5 erhitzt). Die DNAs wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRV (P1532) und HindIII (P680) geschnitten. Als Größenreferenz wurde HindIII-geschnittene DNA des Phagen Lambda aufgetragen (Bahnen 1 und 6). Die Pfeile markieren die zusätzlich auftretenden Banden nach der Erhitzung.

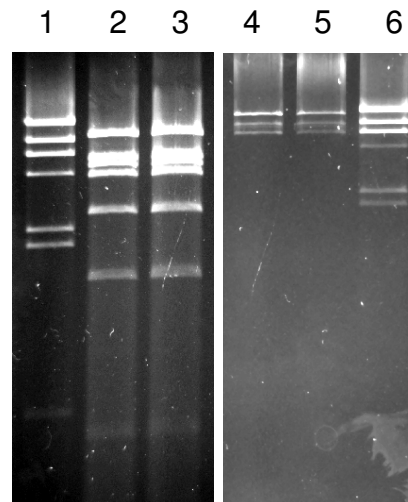


Abbildung 3.14: Agarosegel (1,5 %) der erhitzten und unerhitzten Restriktionsansätze ligierter DNA der *L. lactis* Phagen P1532 (Bahn 2 unerhitzt, Bahn 3 erhitzt) und P680 (Bahn 4 unerhitzt, Bahn 5 erhitzt). Die DNAs wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRV (P1532) und HindIII (P680) geschnitten. Als Größenreferenz wurde HindIII-geschnittene DNA des Phagen Lambda aufgetragen (Bahnen 1 und 6).

3.2.3.4 Bestimmung der Genomgröße der hitzestabilen Phagen P1532 und P680

Die Genomgröße kann einen entscheidenden Einfluss auf die Hitzestabilität haben (Rubenstein, 1968). Um zu überprüfen, ob dieser Faktor eine Rolle für die Hitzestabilität der Phagen P680 und P1532 spielt, wurde die Genomgröße dieser Phagen mittels PFGE im Vergleich zu den *L. lactis* Phagen P001 (c2-Spezies) und P008 bestimmt (Abbildung 3.15). Der Phage P1532 zeigte annähernd die gleiche Genomgröße wie der Phage P008 (ca. 29 kb). Der Phage P680 wies ein etwas größeres Genom auf (ca. 31 kb).

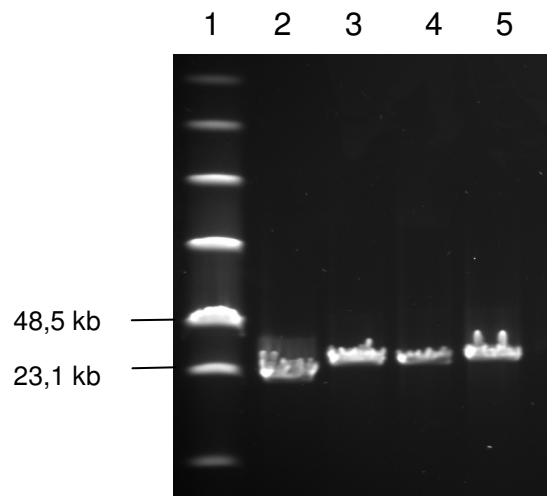


Abbildung 3.15: PFGE ungeschnittener DNA der Phagen P001 (Bahn 2), P008 (3), P680 (4) und P1532 (5). Als Größenreferenz wurde Low Range PFG Marker (NEB, Frankfurt) verwendet. Genomgröße P001: 20 kb und P008: 28,5 kb.

3.2.3.5 Vergleich der Strukturproteine der hitzeresistenten *L. lactis* Phagen

Die beiden hitzeresistenten Phagen P1532 und P680 wurden über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und konzentriert und die Phagenstrukturproteine in der SDS-PAGE im Vergleich zum P008 Referenzphagen der *L. lactis* 936-Phagenspezies untersucht. Die Abb. 4.9 zeigt, dass für diese Phagen eine Hauptproteinbande in der SDS-PAGE erscheint, deren molekulare Größe anhand der Referenzbanden des Größenstandards zwischen 35 und 40 kDa bestimmt werden konnte. Dabei wurde deutlich, dass die Größe dieses Hauptstrukturproteins bei den thermostabilen Testphagen P1532 und P680 geringer war als die des P008-Referenzphagen.

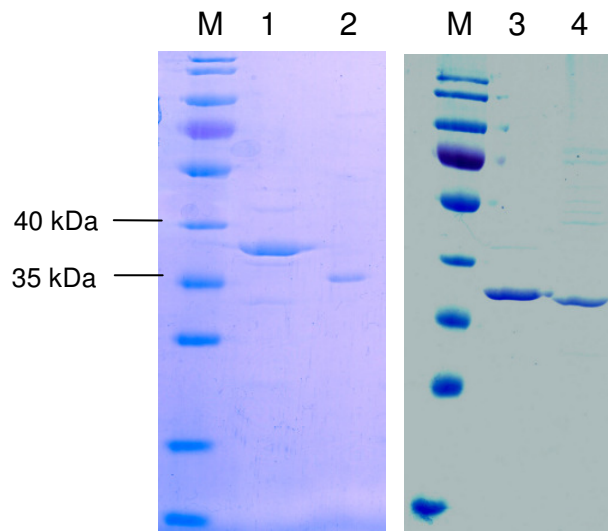


Abbildung 3.16: SDS-PAGE der Strukturproteine der hitzeresistenten *L. lactis* Phagen P680 (Bahn 2) und P1532 (Bahn 4) im Vergleich zum *L. lactis* Phagen P008 (Bahnen 1 und 3). Auf der Bahn M wurde ein Proteingrößenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot) als Referenz aufgetragen.

3.2.3.6 Bestimmung der Nachweisgrenze der PCR-Detektion

Um sicher zu gehen, dass sich die hitzestabilen Phagen mit der gleichen Empfindlichkeit wie die von anderen Phagen der 936-Spezies nachweisen lassen, wurde die Detektionsgrenze des PCR-Nachweises bestimmt. Dazu wurden die Phagen P680 und P1532 hochtitrig in einer standardisierten Sauermolke suspendiert (Titer: 2×10^9 PbE/ml) und anschließend in einer dezimalen Verdünnungsreihe weiter mit der gleichen Molke verdünnt. Die phagenhaltigen Molken wurden in einem Multiplex-PCR-Ansatz mit den spezifischen Primern für die 936- und c2-Spezies getestet. Wie Abbildung 3.17 für den Phagen P1532 zeigt, sind die hitzestabilen Phagen bis zu einem Titer von 2×10^4 PbE/ml in Molke nachweisbar. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen für andere Phagen der 936-Spezies (Labrie & Moineau, 2000).

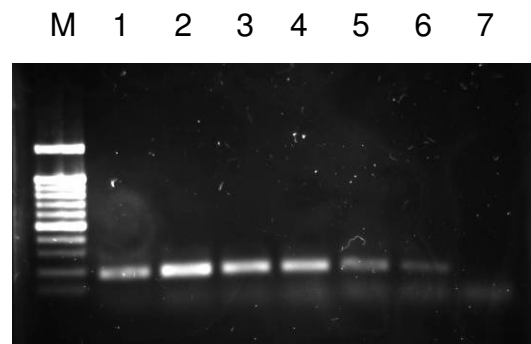


Abbildung 3.17: Bestimmung der Detektionsgrenze des PCR-Nachweises zur Speziesbestimmung des *L. lactis* Phagen P1532. Agarosegel (1,5 %) der PCR-Amplifikate mit den spezifischen Primern für die 936- und c2-Spezies. Bahn 1 (2×10^9 PbE/ml), 2 (2×10^8 PbE/ml), 3 (2×10^7 PbE/ml), 4 (2×10^6 PbE/ml), 5 (2×10^5 PbE/ml), 6 (2×10^4 PbE/ml), 7 (2×10^3 PbE/ml). Bahn M zeigt den Größenstandard (100 bp DNA Ladder AppliChem, Darmstadt).

3.2.3.7 *S. thermophilus* Phagen

Differenzierung des *Streptococcus thermophilus* Phagen-DNA-Verpackungstyps (*cos*- und *pac*-Typ) mittels PCR

Für die *S. thermophilus* Phagen stehen Primer für den PCR-Nachweis der Gene der Hauptkopproteine der *cos*- und *pac*-Phagen zur Verfügung (Ali *et al.*, 2006) (Tabelle 2.7). Die Typzugehörigkeit der *S. thermophilus* Phagen wurde mit dieser PCR überprüft (Tabelle 3.7). Insgesamt wurden drei *S. thermophilus* Phagen als *pac*-Typ und neun *S. thermophilus* Phagen als *cos*-Typ identifiziert.

Tabelle 3.7: Übersicht der *cos*- bzw. *pac*-Typ Zuordnung der *S. thermophilus* Phagen des Phagenmonitorings

Herkunft	Phage	Typ
Betrieb 2	P619	<i>cos</i>
	P621	<i>cos</i>
Betrieb 9	P631	<i>cos</i>
Kulturen- hersteller	CHPC572	<i>cos</i>
	CHPC595	<i>cos</i>
	CHPC640	<i>pac</i>
	CHPC1005	<i>cos</i>
	CHPC1006	<i>cos</i>
	CHPC1014	<i>cos</i>
	FAPC253	<i>pac</i>
	FAPC254	<i>cos</i>
	FAPC255	<i>pac</i>

3.2.3.8 *Ln. mesenteroides* Phagen

Um die genetische Verwandtschaft dieser Phagen zu untersuchen, wurden DNA/DNA-Hybridisierungen durchgeführt. Die DNA des Phagen P728 wurde hierbei als Sonde verwendet. Es ergaben sich trotz unterschiedlicher Restriktionsprofile sehr deutliche Signale bei der Hybridisierung (Abbildung 3.18) und somit eine hohe genetische Verwandtschaft der *Ln. mesenteroides* Phagen.

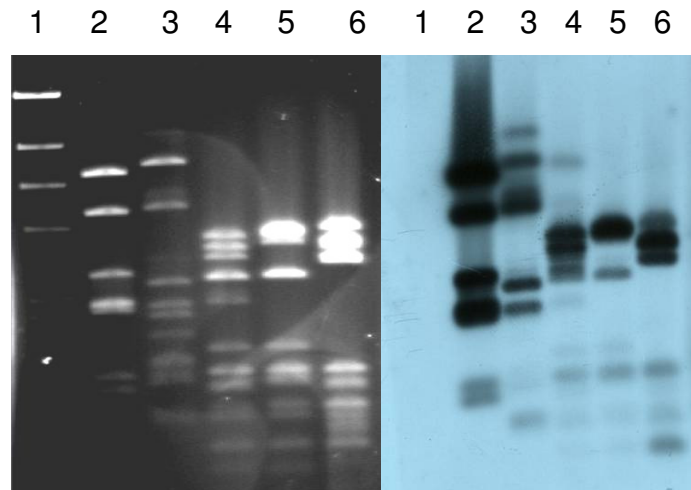


Abbildung 3.18: DNA/DNA-Hybridisierung (Southern-Blot) der *Ln. mesenteroides* Phagen P958 (Bahn 3), P154 (4), P4556 (5) und P1599 (6) mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde des *Ln. mesenteroides* Phagen P728 (2). Als Größenreferenz wurde HindIII-geschnittene DNA des Phagen Lambda (1) verwendet. Alle DNAs wurden mit HaeIII geschnitten.

3.3 Thermoresistenz der Phagen mesophiler und thermophiler Milchsäurebakterien

3.3.1 *L. lactis* Phagen

Die Übersicht der thermischen Inaktivierung der Laktokokkenphagen (Tabelle 3.8) dokumentiert eine deutlich erkennbare Korrelation der Hitzestabilität mit der Phagenspezies. Dabei sind verschiedene Gruppen von Phagen erkennbar:

In die Gruppe der hitzesensitivsten Laktokokkenphagen lassen sich alle Phagenisolate der 949- und der P335 Phagen vom BK5-T-Typ einordnen. Mit Ausnahme des Phagen P204 wurden Phagen dieser Spezies komplett bei 60 - 65 °C inaktiviert. Die Inaktivierung der BK5-T-Phagen erforderte in den Suspensionsmedien Magermilch und Wasser höhere Temperaturen als in dem LM17-Testmedium.

Die beiden prolaten Phagen der seltenen P034-Phagenspezies weisen ein homogenes thermisches Inaktivierungsmuster auf. Die höchste Thermostabilität wurde in Magermilch dokumentiert. In diesem Medium war eine 1-minütige Inkubation bei 75 °C erforderlich, um das Phagenlysat komplett zu inaktivieren.

Die prolaten Phagenisolate der weitverbreiteten Spezies P001 und die neue Phagenspezies Q54 zeigten ebenfalls ein einheitliches Bild in den Inaktivierungsversuchen. Sie wurden – unabhängig vom Suspensionsmedium – bei 75 - 80 °C vollständig inaktiviert. Diese Temperaturgrenze wurde auch für die Phagenvertreter der seltenen P087-Phagenspezies dokumentiert.

Uneinheitliche Inaktivierungsmuster ergaben sich allerdings für die morphologisch ähnlichen Vertreter der 936- und P335-Phagen vom r1t- und TP901-1-Typ. Während die „alten“ 936-Phagen, die vor mehreren Jahrzehnten isoliert worden waren, bereits bei 80 °C in allen 3 Suspensionsmedien vollständig inaktiviert wurden, zeigten mehrere „neue“ Isolate eine sehr hohe Thermoresistenz. Die extreme Thermoresistenz der Phagen P680, P1532 und P1569 wurde von Müller-Merbach & Hinrichs (2006) in einer 5-minütigen Erhitzung ermittelt. In vorliegender Arbeit wurden sie in den 1-minütigen Erhitzungsversuchen als Referenzphagen mitgeführt. Der Phage P4565 erwies sich als ebenfalls sehr hitzestabil und war nach 1 min Erhitzung bei 95 °C in LM17-Bouillon und Magermilch noch nachweisbar (Reduktion des Phagentiters um jeweils 7 log-Einheiten). Zur Abtötung der r1t- und TP901-1-

ähnlichen Phagen waren je nach Phagenisolat Temperaturen von 75 - 85 °C erforderlich.

Insgesamt gesehen stellt die Temperatur von 80 °C eine Hürde dar, die nur von wenigen *L. lactis* Phagen überschritten werden kann. Wie aus Abbildung 3.19 ersichtlich, überlebten nur die Phagen TP901-1, P1532, P680, P1569, P706 und P4565 eine 1-minütige Erhitzung bei 80 °C. Allerdings wird der Phage TP901-1 bei dieser Temperatur sehr stark inaktiviert, so dass nur noch sehr wenige aktive Phagen nachgewiesen werden konnten. Die Reduktion der Titer der anderen Phagen war dagegen deutlich vermindert (2-5 log-Stufen für den Phagen P706, 1-3 log-Einheiten für die Phagen P4565 und P1569). Die Reduktion der hitzestabilsten Phagen P1532 und P680 war bei dieser Testtemperatur kaum erfassbar (< 1 log-Einheit).

Tabelle 3.8: Thermische Inaktivierung der *L. lactis* Phagen. Hochtitrige Phagenlysate wurden in LM17-Bouillon (L), Magermilch (M) und in Wasser (H) für 1 min erhitzt.

<i>L. lactis</i> Phagen				Inaktivierungstemperatur (1 min)										
Typ	Bezeichnung	Jahr der Isolierung	Ausgangstiter PbE/ml	50 °C	55 °C	60 °C	65 °C	70 °C	75 °C	80 °C	85 °C	90 °C	95 °C	100 °C
P034	P034	1978	6x10 ⁵ -3x10 ⁶				- M H	- M -	- - -					
P034	P369	1981	8x10 ⁴ -3x10 ⁵				- M H	- M -	- - -					
c2	P001	1971	2x10 ⁸				L M H	L M H	- - -					
c2	CHPC204	2005	1x10 ⁷ -3x10 ⁷					L M H	L M -	- - -				
c2	CHPC364	2005	7x10 ⁹ -1x10 ¹⁰					L M H	L M H	- - -				
c2	CHPC649	2005	3x10 ⁹ -7x10 ⁹					L M H	L M H	- - -				
Q54	Q54	unbekannt	4x10 ⁸				L M H	L M H	L M H	- - -				
936	936	1977	1x10 ⁹ -2x10 ⁹				L M H	L M H	L M H	- - -				
936	P008	1971	1x10 ⁸				L M H	L M H	L M H	- - -				
936	P4565	2006	1x10 ⁸ -2x10 ⁸				L M H	L M H	L M H	L M H	L M H	L M H	L M -	- M -
936	P1532	2005	3x10 ⁷ -8x10 ⁷							L M H	L M H	L M H	L M H	L M -
936	P680	2005	2x10 ⁷ -2x10 ⁸							L M H	L M H	L M H	L M H	- M -
936	P1569	2005	1x10 ⁸ -4x10 ⁸					L M H	L M H	L M H	- M H	- - H	- - -	
P335-[r1t]	r1t	1977	3x10 ⁷ -5x10 ⁷				L M H	L M H	- M H	- - -				
P335-[r1t]	P566	1999	2x10 ⁸				L M H	L M H	- M H	- - -				
P335-[r1t]	P706	2006	5x10 ⁶				L M H	L M H	L M H	L M H	- - -			
P335	P335	1979	2x10 ⁷ -4x10 ⁷				L M H	L M H	- - -					
P335	P581	2002	3x10 ⁶ -4x10 ⁶				L M H	L M H	- M H	- - -				

Fortsetzung Tabelle 3.8

<i>L. lactis</i> Phagen				Inaktivierungstemperatur (1 min)										
Typ	Bezeichnung	Jahr der Isolierung	Ausgangstiter PbE/ml	50 °C	55 °C	60 °C	65 °C	70 °C	75 °C	80 °C	85 °C	90 °C	95 °C	100 °C
P335	TP901-1	lysogene Kultur	8x10 ⁷ -1x10 ⁸				L M H	L M H	L M H	L M -	- - -			
P335-[BK5-T]	BK5-T	lysogene Kultur	3x10 ⁸ -5x10 ⁸	L M H	L M H	- - -								
P335-[BK5-T]	P553	1995	8x10 ⁷ -2x10 ⁸	L M H	L M H	- M H	- - -							
P335-[BK5-T]	P572	2001	5x10 ⁵ -8x10 ⁵	L M H	- M H	- M H	- - -							
P335-[BK5-T]	P606	2004	4x10 ⁹ -7x10 ⁷		- M H	- - -	- - -							
P335-[BK5-T]	CHPC412	2005	6x10 ⁸ -9x10 ⁸		L M H	- M H	- - -							
P335	P204	1978	2x10 ⁸ -4x10 ⁸				L M H	- - -						
949	P570	1999	8x10 ⁴ -2x10 ⁵	L M H	- M H	- M -	- - -							
949	CHPC21	2005	8x10 ⁷ -2x10 ⁸		L M H	- M H	- - -							
949	CHPC310	2005	3x10 ⁶ -1x10 ⁷		L M H	L M -	- - -							
P087	P087	1978	1x10 ⁸				L M H	L M H	- M H	- - -				
P087	P596	2003	2x10 ⁷				L M H	L M H	- - -					
1358	P446	1990	1x10 ⁸ -2x10 ⁸				L M H	- - -						

L M H : Phagen nach 1 min Erhitzung in LM17-Bouillon (L), Magermilch (M), Wasser (H) noch im Plaquetest nachweisbar.

- : Keine Phagen mehr nachweisbar (Nachweisgrenze: 2 PbE/ml).

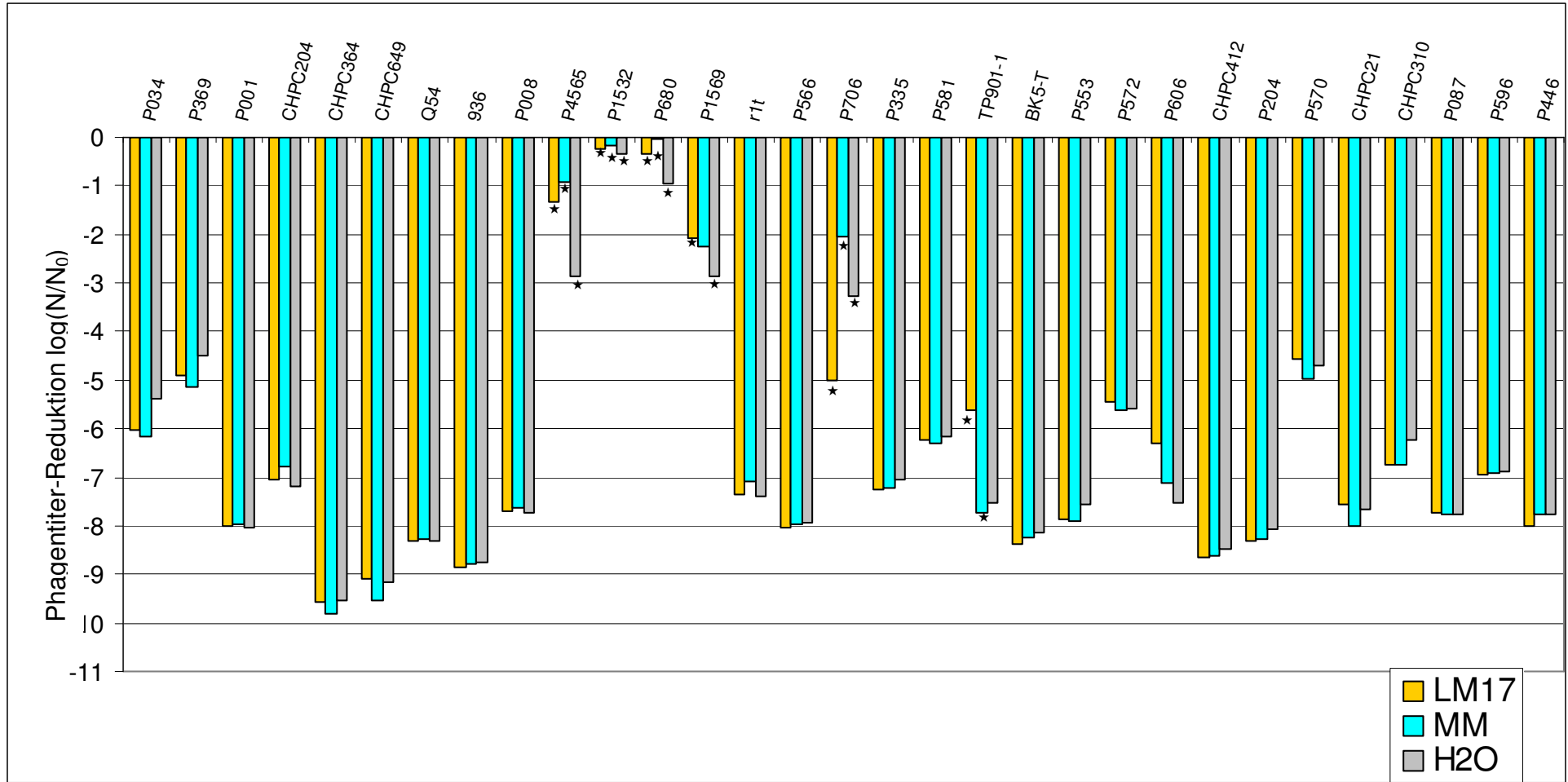


Abbildung 3.19: Übersicht der Inaktivierungen der *L. lactis* Phagen (vgl. auch Tabelle 3.8) bei 80 °C (1 min) in den Suspensionsmedien LM17-Bouillon (LM17), Magermilch (MM) und Wasser (H₂O). Angegeben sind die Reduktionen der Phagentiter (log N/N₀). Die mit einem ★ gekennzeichneten Phagen waren nach der thermischen Behandlung noch im Suspensionsmedium nachweisbar. Phagen ohne Kennzeichnung wurden komplett inaktiviert (Nachweisgrenze 2 PbE/ml).

3.3.2 Hitzeresistenz der *L. lactis* 936 Phagen Isolate verschiedener Jahre aus einem Betrieb

Für die Sammlung des Instituts wurden über Jahrzehnte hinweg Phagen aus einem Molkerei-Betrieb isoliert. Diese Phagenisolate wurden verwendet, um zu überprüfen, ob sich die Thermoresistenz von Phagen im Laufe der Jahre durch Anpassung an die Bedingungen in der Molkerei erhöht. Dazu wurden insgesamt elf Phagen der *L. lactis* 936-Spezies, die in verschiedenen Jahren aus einem Betrieb isoliert worden waren, aus der Sammlung des Instituts ausgewählt. Für diese Phagen wurde schon in früheren Arbeiten gezeigt, dass es sich um einen genetisch sehr homogenen Phagenpool handelt (Laborius, 2004). Die Phagen wurden in Wasser suspendiert und wie zuvor beschrieben erhitzt. Eine 1-minütige Erhitzung bei 80 °C stellte für die Typphagen der 936-Spezies (P008, 936, sk1) die niedrigste Inaktivierungstemperatur dar. Phagenisolate der Jahre 1985 bis 1999 überlebten diese Temperatur (Abbildung 3.20), jedoch ging diese Hitzeresistenz bei Isolaten der Jahre 1999 bis 2007 wieder zurück. Die „Betriebsphagen“ wiesen somit eine leicht erhöhte Thermoresistenz im Vergleich zu den Typphagen auf, man kann jedoch nicht von einer Erhöhung der Hitzeresistenz im Laufe der Jahre sprechen.

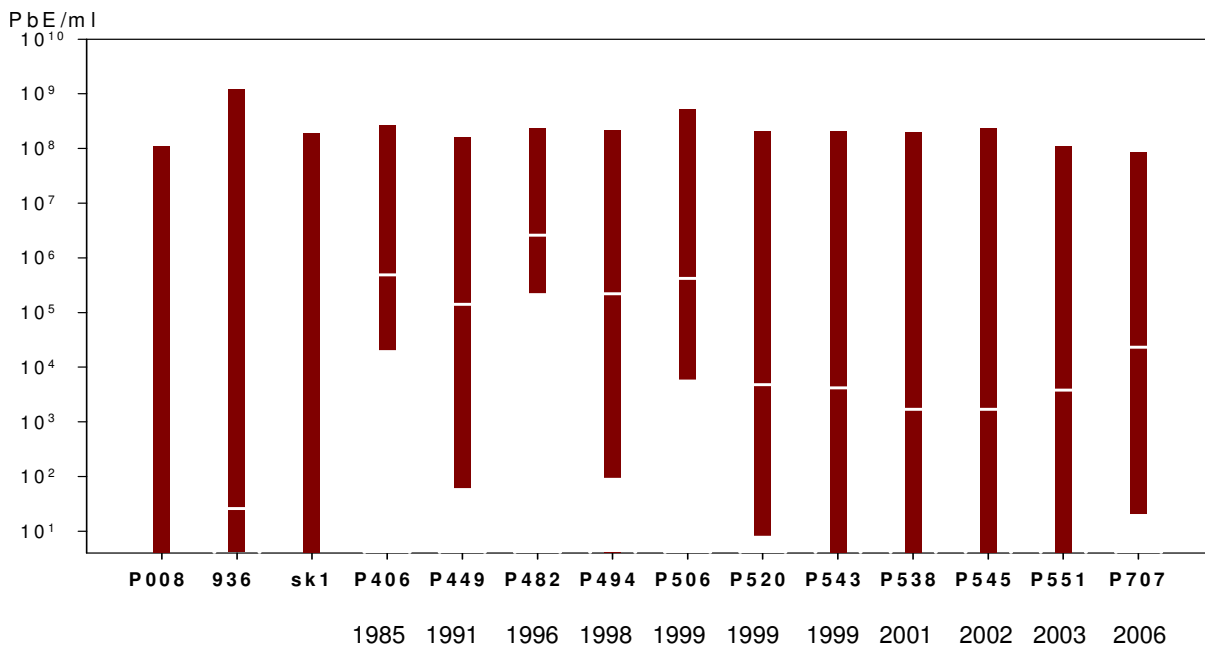


Abbildung 3.20: Thermische Inaktivierung der *L. lactis* 936 Phagenisolate aus einem Betrieb bei 80 °C (1 min) in Wasser. Oberer Rand der Balken: Ausgangstitertiter, horizontale weiße Linie: Resttiter nach 1 min Aufheizphase, unterer Rand des Balkens: Resttiter nach 1 min Erhitzung (Nachweisgrenze 2 PbE/ml). Die Referenzphagen P008, 936 und sk1 wurden als Kontrolle mit aufgeführt. Die Jahreszahl unterhalb der Phagenbezeichnung gibt das Jahr der Isolierung an.

3.3.3 Thermoresistenz des *L. lactis* Phagen TP901-1 im Vergleich zum Derivat TP901-BC1034 mit zusätzlicher 1,1-kb-Genominserktion

Von dem P335-Phagen TP901-1 stand ein Derivat zur Verfügung, das mit einer zusätzlichen 1,1-kb Insertion in einem nicht-essentiellen Genombereich versehen worden war (Phage TP901-BC1034) (Koch *et al.*, 1997). Das 1,1-kb-Fragment trug ein zusätzliches „Marker“-Gen für eine Erythromycinresistenz. Dieser Phage wurde im Vergleich zu seinem Ursprungsphagen TP901-1 auf seine Hitzestabilität hin überprüft. Wie in Abbildung 3.21 ersichtlich, zeigte der Ursprungsphage TP901-1 eine deutlich höhere Thermoresistenz als das modifizierte Derivat.

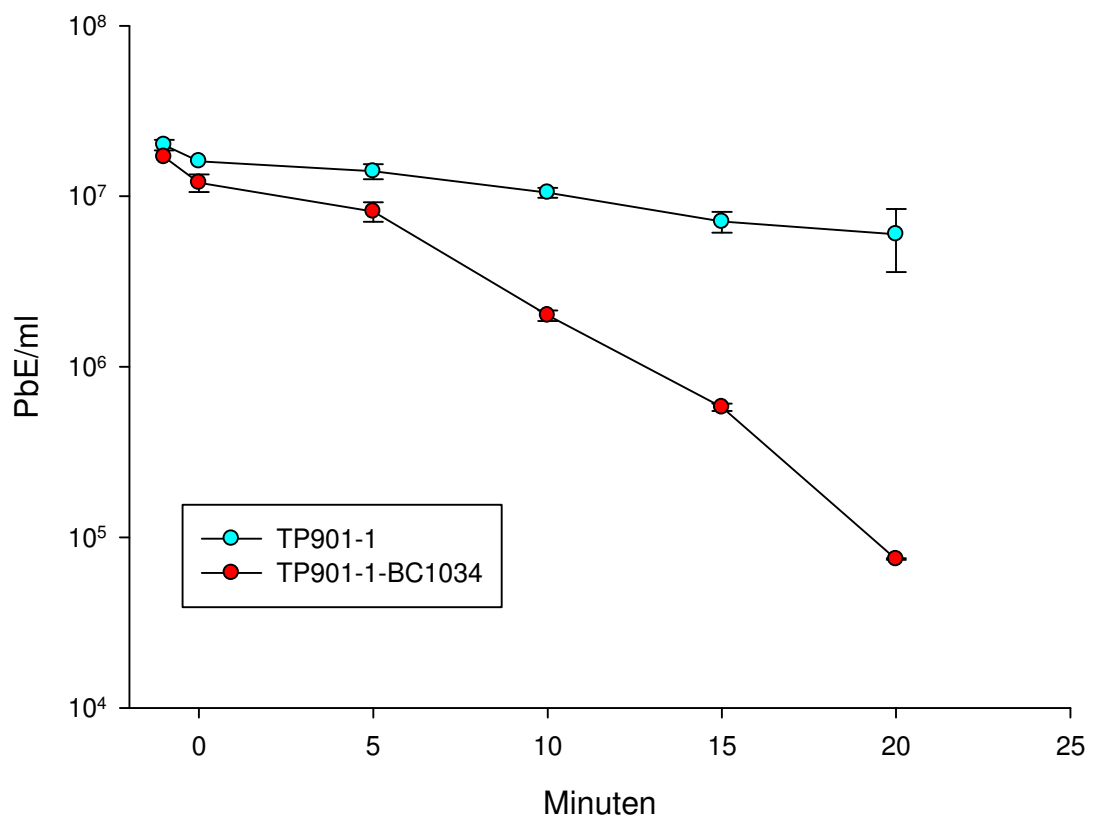


Abbildung 3.21: Thermische Inaktivierung der *L. lactis* Phagen TP901-1 und TP901-BC1034 bei 60 °C, Suspensionsmedium: Wasser. n = 2

3.3.4 Thermische Inaktivierung des *L. lactis* Phagen P008 mit unterschiedlicher spezifischer Dichte

Mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation wurde gezeigt, dass hitzestabile Mutanten des Coliphagen T5 eine geringere spezifische Dichte aufweisen als die T5-Wildtyp-Phagen (Adams & Lark, 1950; Hertel *et al.*, 1962). Die geringere Dichte der T5-Mutanten korrelierte dabei mit einer kleineren Genomgröße (Rubenstein, 1968).

Um dies ebenfalls für einen *L. lactis* Referenzphagen zu überprüfen, wurden Derivate des Phagen P008 (936-Spezies) mit geringerer spezifischer Dichte durch wiederholte CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Die Hauptphagenbande des 1. Gradienten wurde einer CsCl-Dichte von 1,41 g/ml zugeordnet (Abbildung 3.22). Für den 2. Gradienten wurden P008 Phagen unterhalb des Phagen-„Hauptpeaks“ aus dem Dichtebereich 1,38 (g/ml) angezüchtet und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Hierbei ergab sich eine geringfügige Verschiebung der Hauptphagenbande im CsCl-Dichtegradienten (1,40 g/ml). Diese Hauptphagenfraktion wurde erneut angezüchtet und einer 3. CsCl-Gradientenzentrifugation unterzogen. Auch in diesem Gradienten wurde der Phagen-„Peak“ bei einer verringerten Dichte von 1,40 g/ml nachgewiesen.

Zur Überprüfung der Hitzestabilität wurden die CsCl-Lysate der P008-Derivate in Wasser suspendiert und wie zuvor beschrieben erhitzt. Aus Abbildung 3.23 wird deutlich, dass der P008 Phage mit der höheren spezifischen Dichte eine höhere Hitzeresistenz aufweist als derjenige mit der geringeren spezifischen Dichte.

Die DNAs der unterschiedlichen P008-Derivate wiesen in der Restriktionsanalyse keine erkennbaren Veränderungen auf (Abbildung 3.24). Beim *L. lactis* Phagen P008 konnte daher nicht wie beim Coliphagen T5 gezeigt werden, dass Phagen mit geringerer spezifischer Dichte eine höhere Thermoresistenz aufweisen.

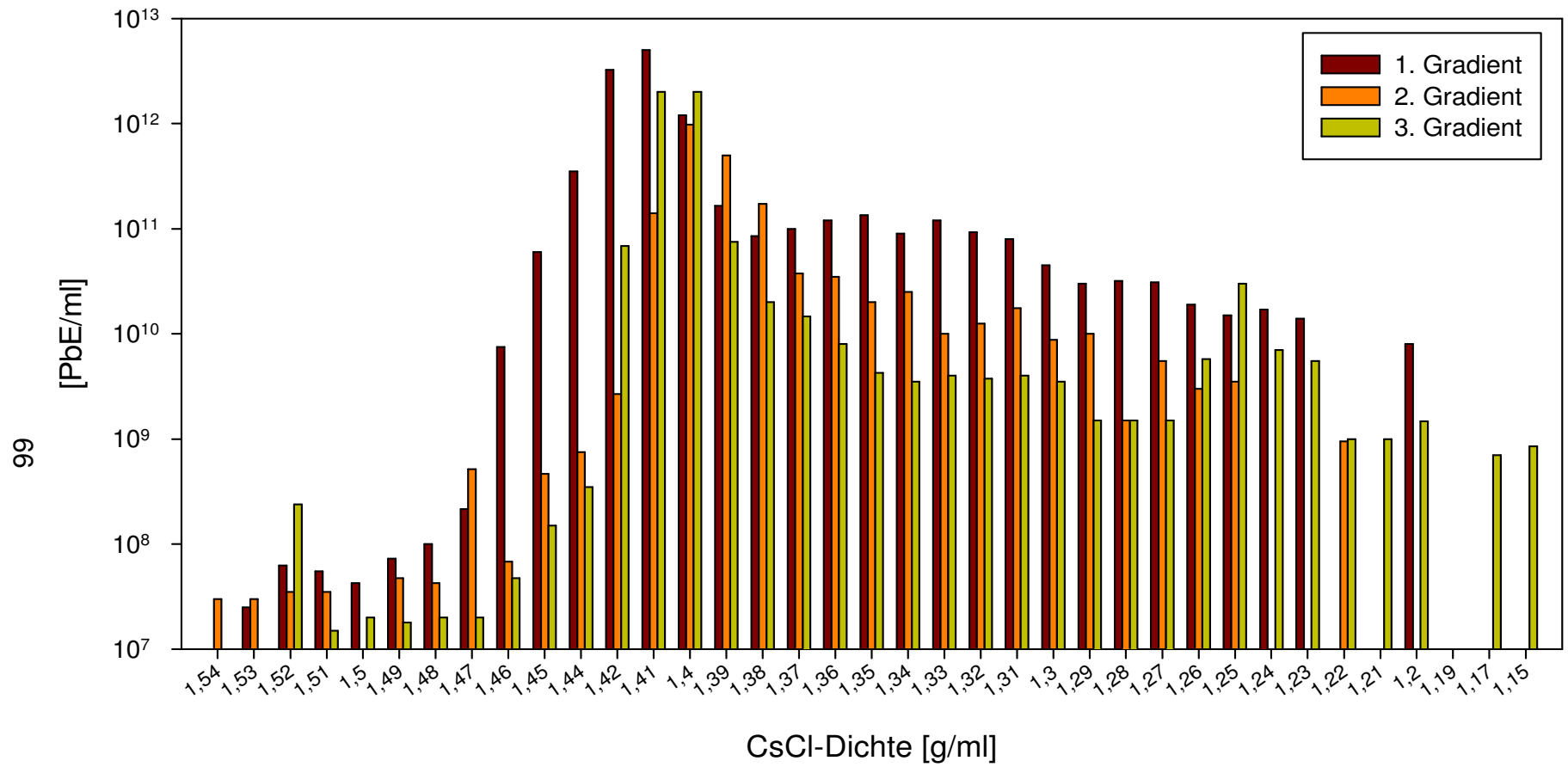


Abbildung 3.22: Verteilung der P008-Phagentiter in ausgetropften CsCl-Dichtegradienten während einer 3-fach wiederholten CsCl-Dichtegradientenzentrifugation.

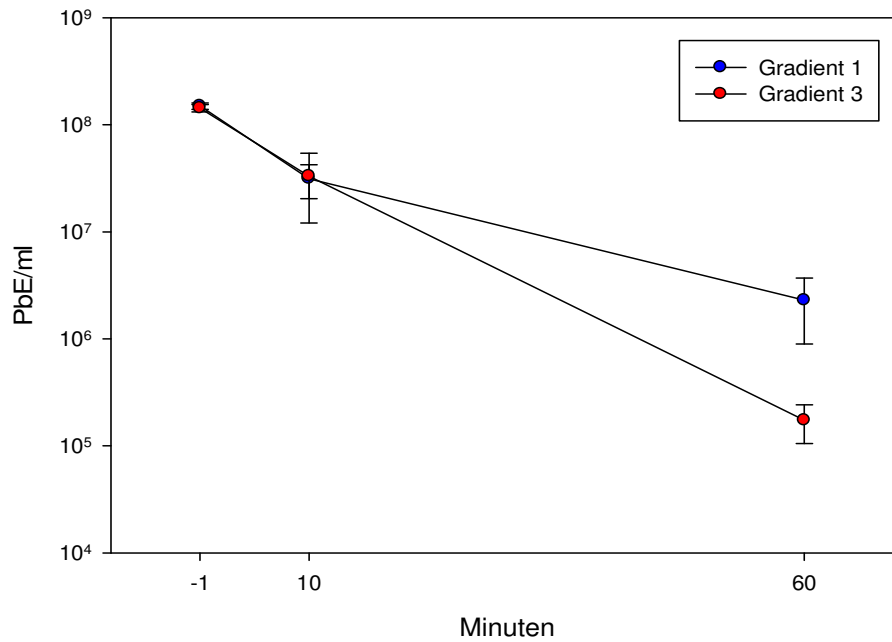


Abbildung 3.23: Thermische Inaktivierung des P008 Phagen unterschiedlicher Dichte bei 65 °C in Wasser. Gradient 1: Phagen aus der Hauptphagenbande des 1. CsCl-Gradienten mit einer Dichte von 1,41 g/ml, Gradient 3: Phagen aus der Hauptphagenbande des 3. CsCl-Gradienten mit einer verringerten Dichte von 1,40 g/ml. n = 2

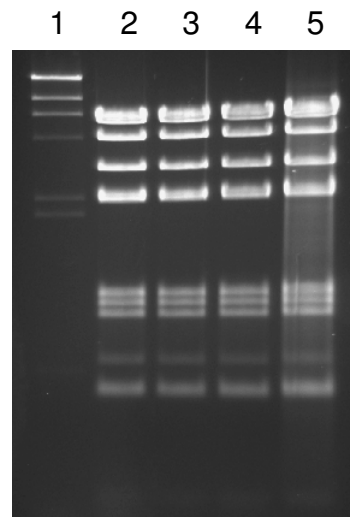


Abbildung 3.24: Vergleich der P008-Phagen-DNA nach 1 bis 3 aufeinander folgenden CsCl-Dichtegradientenzentrifugationen der Phagen. HpaII-Restriktionsverdau der DNA des Phagen P008 nach der 1. Zentrifugation (Bahn 3), nach der 2. Zentrifugation (Bahn 4) und nach der 3. Zentrifugation (Bahn 5). Als Kontrolle wurde HpaII-geschnittene DNA des unbehandelten P008 Phagen mitgeführt (Bahn 2). Als Größenreferenz wurde HindIII geschnittene DNA des Phagen Lambda verwendet (Bahn 1).

3.3.5 *S. thermophilus* Phagen

S. thermophilus Phagen weisen die gleiche Morphologie wie *L. lactis* P335-Phagen des BK5-T-Typs auf (Huggins & Sandine, 1977; Krusch *et al.*, 1987). Sie unterscheiden sich aber, wie hier gezeigt, deutlich in ihrer Thermoresistenz von den Laktokokkenphagen, da die BK5-T Phagen bereits bei 65 °C inaktiviert wurden (Tabelle 3.9). Zur Inaktivierung der hitzestabilsten thermophilen Phagen war dagegen eine Temperatur von 80 °C erforderlich. Vier Phagen wurden in allen drei Suspensionsmedien geprüft, wobei die Inaktivierungsdaten sich nicht wesentlich unterschieden. Obwohl *S. thermophilus*-Phagen des *cos*- und *pac*-Typs unterschiedliche Strukturproteine aufweisen, zeigten sie ähnliche Spannbreiten bei der Inaktivierung (Inaktivierungstemperaturen von 70 bis 80 °C).

Aus Abbildung 3.25 geht hervor, dass selbst die Phagen, die eine 1-minütige Erhitzung bei 75 °C überlebten, bei dieser Temperaturhürde bereits eine Titerreduktion von 4-8 log-Stufen aufwiesen. Eine geringere Reduktion wurde für den Phagen FAPC254 bei dieser Temperatur erzielt (2-3 log-Einheiten).

Tabelle 3.9: Thermische Inaktivierung der *cos*- und *pac*-Typ *S. thermophilus* Phagen. Die hochtitrigen Phagenlysate wurden in LM17-Bouillon (L), Magermilch (M) und in Wasser (H) für 1 min erhitzt.

<i>S. thermophilus</i> Phagen			Inaktivierungstemperatur (1 min)						
Typ	Bezeichnung	Ausgangstitert PbE/ml	65 °C	70 °C	75 °C	80 °C	85 °C	90 °C	95 °C
<i>cos</i>	PSt ^a	8x10 ⁷	L	-					
<i>cos</i>	P53	2x10 ⁷	L M H	L M H	L M H	- - -			
<i>cos</i>	a10/J9 ^a	2x10 ⁶	L	L	-				
<i>cos</i>	P1109 ^a	4x10 ⁷	L	L	-				
<i>cos</i>	CHPC 1005 ^a	2x10 ⁸	L	L	-				
<i>cos</i>	CHPC 1006 ^a	3x10 ⁸	L	L	L				
<i>cos</i>	CHPC 1014	9x10 ⁵ -2x10 ⁹	L M H	L M H	L M H	- - -			
<i>cos</i>	CHPC 572	7x10 ⁷ -3x10 ¹⁰	L M H	L M H	- - -				
<i>cos</i>	CHPC 595 ^a	5x10 ⁷	L	L	-				
<i>cos</i>	FAPC254	2x10 ⁷	L M H	L M H	L M H	- - -			
<i>pac</i>	P6 ^a	2x10 ⁷	L	L	L	-			
<i>pac</i>	P8	2x10 ⁶	L M H	L M H	L - H	- - -			
<i>pac</i>	CHPC 640	2x10 ⁶ -2x10 ⁹	L - -	- - -					

L M H: Phagen nach 1 min Erhitzung in LM17-Bouillon (L), Magermilch (M), Wasser (H) noch im Plaquetest nachweisbar.

- : Keine Phagen mehr nachweisbar (Nachweisgrenze: 2 PbE/ml).

^a: Nur in LM17-Bouillon geprüft.

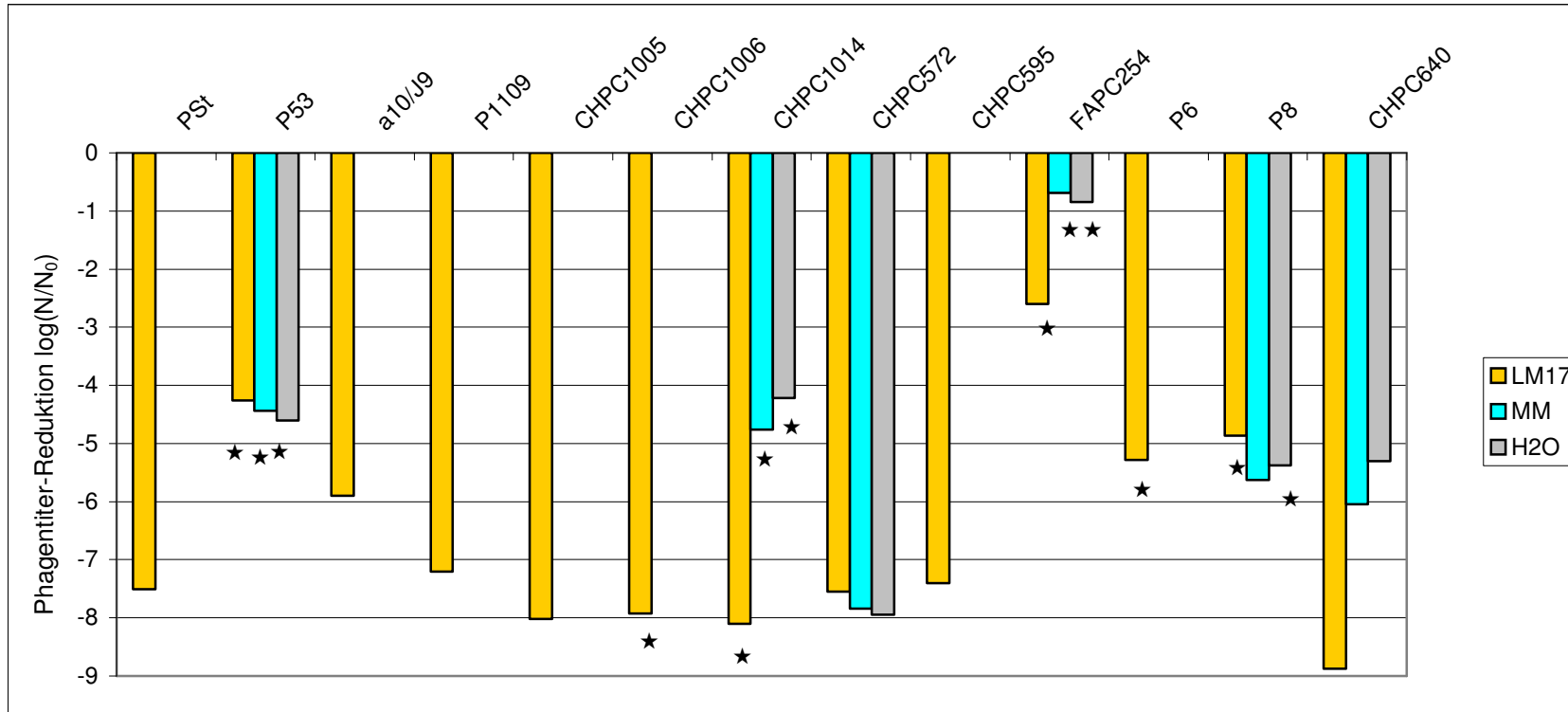


Abbildung 3.25: Übersicht der Inaktivierungen der *S. thermophilus* Phagen (vgl. auch Tabelle 3.9) bei 75 °C (1 min) in den Suspensionsmedien LM17-Bouillon (LM17), Magermilch (MM) und Wasser (H₂O). Angegeben sind die Reduktionen des Phagentiters (log N/N₀). Die mit einem ★ gekennzeichneten Phagen waren nach der thermischen Behandlung noch im Suspensionsmedium nachweisbar. Phagen ohne Kennzeichnung wurden komplett inaktiviert (Nachweisgrenze 2 PbE/ml). Die Phagen PSt, a10/J9, P1109, CHPC1005, CHPC1006, CHPC595 und P6 wurden nur in LM17-Bouillon erhitzt.

3.3.6 *Ln. mesenteroides* Phagen

Für das Hitzescreening standen fünf *Ln. mesenteroides* Phagenlysate zur Verfügung. Diese waren (bis auf Phage P4556) erst nach einer 1-minütigen Erhitzung bei 85 °C nicht mehr nachweisbar (Tabelle 3.10). Bemerkenswert war hierbei allerdings die verminderte Thermostabilität der Phagen im Suspensionsmedium Wasser. Hier wurden die Phagen bereits nach 1 min bei 70 °C - 75 °C inaktiviert. Abbildung 3.26 illustriert, dass die Resttiter dieser Phagen bei 80 °C-Erhitzung im Suspensionsmedium MRS-Bouillon deutlich geringer waren als in Magermilch.

Tabelle 3.10: Thermische Inaktivierung der *Ln. mesenteroides* Phagen. Die hochtitrigen Phagenlysate wurden in MRS-Bouillon (B), Magermilch (M) und in Wasser (H) für 1 min erhitzt.

<i>Ln. mesenteroides</i> Phagen		Inaktivierungstemperatur (1 min)				
Bezeichnung	Ausgangstiter PbE/ml	65 °C	70 °C	75 °C	80 °C	85 °C
P958	2×10^7 - 4×10^7	B M H	B M -	B M -	- M -	- - -
P728	3×10^8	B M H	B M -	B M -	B M -	- - -
P4556	2×10^7 - 3×10^7	B M H	B M H	B M -	- - -	
P1594	4×10^7 - 2×10^8		H	-	B M -	- - -
P1599	4×10^7 - 2×10^8		H	-	- M -	- - -

B M H: Phagen nach 1 min Erhitzung in MRS-Bouillon (B), Magermilch (M), Wasser (H) noch im Plaquetest nachweisbar.

- : Keine Phagen mehr nachweisbar (Nachweisgrenze: 2 PbE/ml).

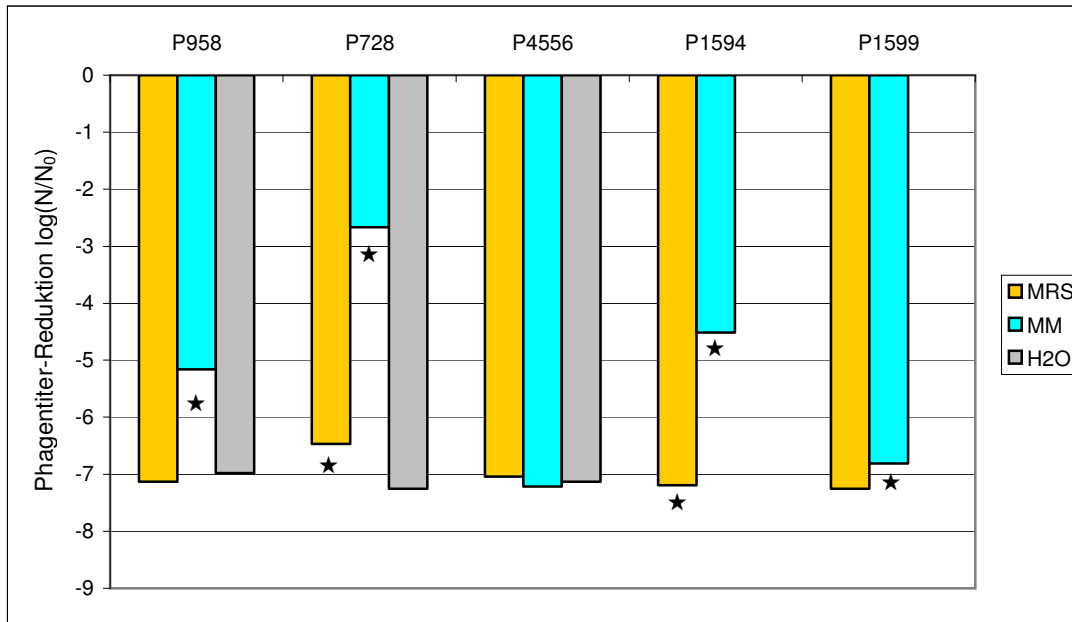


Abbildung 3.26: Übersicht der Inaktivierungen der *Ln. mesenteroides* Phagen (vgl. auch Tabelle 3.10) bei 80 °C (1 min) in den Suspensionsmedien MRS-Bouillon (MRS), Magermilch (MM) und Wasser (H₂O). Angegeben sind die Reduktionen des Phagentiters (log N/N₀). Die mit einem ★ gekennzeichneten Phagen waren nach der thermischen Behandlung noch im Suspensionsmedium nachweisbar. Phagen ohne Kennzeichnung wurden komplett inaktiviert (Nachweisgrenze 2 PbE/ml). Die Phagen P1594 und P1599 wurden nur in den Medien MRS-Bouillon und Magermilch erhitzt

3.3.7 *Lb. delbrueckii* Phagen

Die zur Verfügung gestellten *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* Phagenlysate wurden zusammen mit dem aus der Literatur bekannten und gut charakterisierten *Lb. delbrueckii* spp. *lactis* Phagen LL-H (Tabelle 2.4) auf ihre Hitzestabilität hin überprüft.

Die vollständige Inaktivierung der Phagen in MRS-Bouillon und Magermilch erfolgte bei einer 1-minütigen Erhitzung auf 75 – 80 °C (Tabelle 3.11). Allerdings erwiesen sich die *Lb. delbrueckii* Phagen in Wasser als instabil. Bereits nach dem Resuspendieren der Phagen in Wasser wurde der Phagentiter um 1 log-Stufe reduziert. Bei der Erhitzung im Suspensionsmedium Wasser war die 65 °C-Erhitzung zur vollständigen Inaktivierung ausreichend. Die komplette Inaktivierung dieser thermophilen *Lb. delbrueckii* Phagen erfolgt somit bei der gleichen Temperaturgrenze wie die der thermophilen *S. thermophilus* Phagen.

Tabelle 3.11: Thermische Inaktivierung der *Lb. delbrueckii* Phagen. Die Phagenlysate wurden in MRS (B), Magermilch (M) und in Wasser (H) für 1 min erhitzt.

<i>Lb. delbrueckii</i> Phagen			Inaktivierungstemperatur (1 min)			
Subspezies	Phage	Ausgangstiter PbE/ml	65 °C	70 °C	75 °C	80 °C
<i>lactis</i>	LL-H	5×10^4 - 2×10^6	B M -	B M -	---	
<i>bulgaricus</i>	P1508	2×10^5 - 2×10^6	B M -	B M -	B M -	---
<i>bulgaricus</i>	CHPC658 ^a	1×10^5 - 2×10^6	B M	B M	--	

B M H: Phagen nach 1 min Erhitzung in MRS-Bouillon (B), Magermilch (M), Wasser (H) noch im Plaquetest nachweisbar.

^a: Erhitzung nur in den Suspensionsmedien MRS-Bouillon und Magermilch

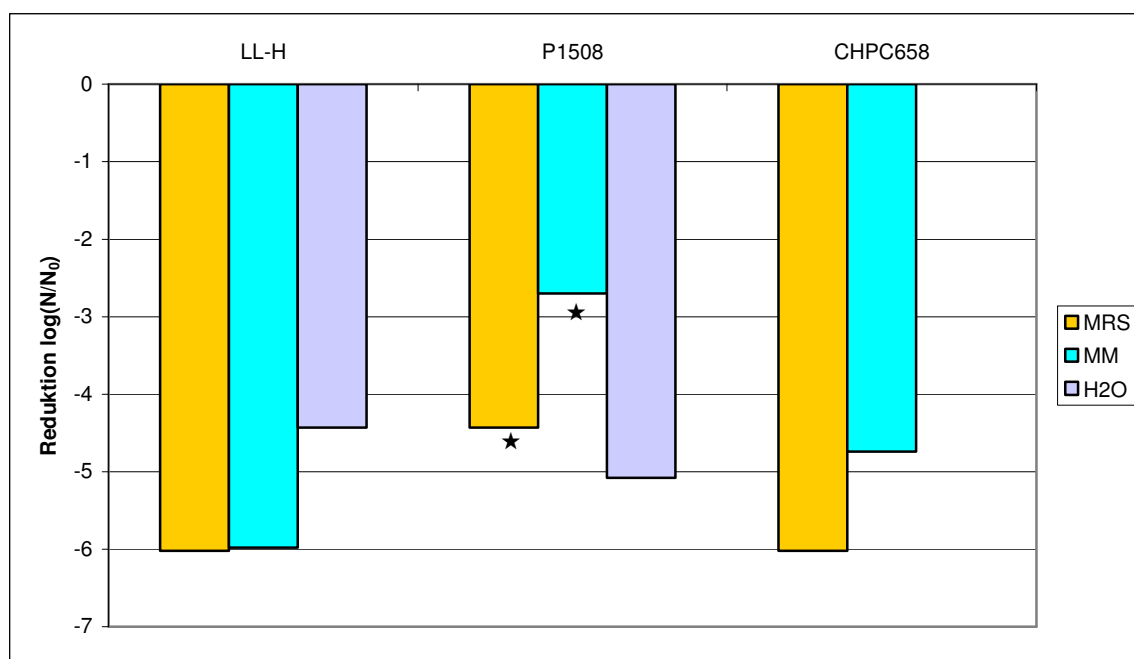


Abbildung 3.27: Übersicht der Inaktivierungen der *Lb. delbrueckii* Phagen (vgl. auch Tabelle 3.11) bei 75 °C (1 min) in den Suspensionsmedien MRS-Bouillon (MRS), Magermilch (MM) und Wasser (H₂O). Angegeben sind die Reduktionen des Phagentiters (log N/N₀). Die mit einem ★ gekennzeichneten Phagen waren nach der thermischen Behandlung noch im Suspensionsmedium nachweisbar. Phagen ohne Kennzeichnung wurden komplett inaktiviert (Nachweisgrenze 2 PbE/ml). Phage CHPC658 wurde nur in MRS-Bouillon und Magermilch erhitzt.

3.4 Einfluss von äußeren Stressfaktoren auf die Hitzestabilität von Phagen

3.4.1 Erhöhter Salzgehalt

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass Laktokokkenphagen in den Salzbadern von Käseereien eine ausgeprägte Langzeitstabilität aufweisen (Neve *et al.*, 2005). Daher sollte geprüft werden, ob die in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen überlebenden Phagen eine erhöhte thermische Stabilität aufweisen.

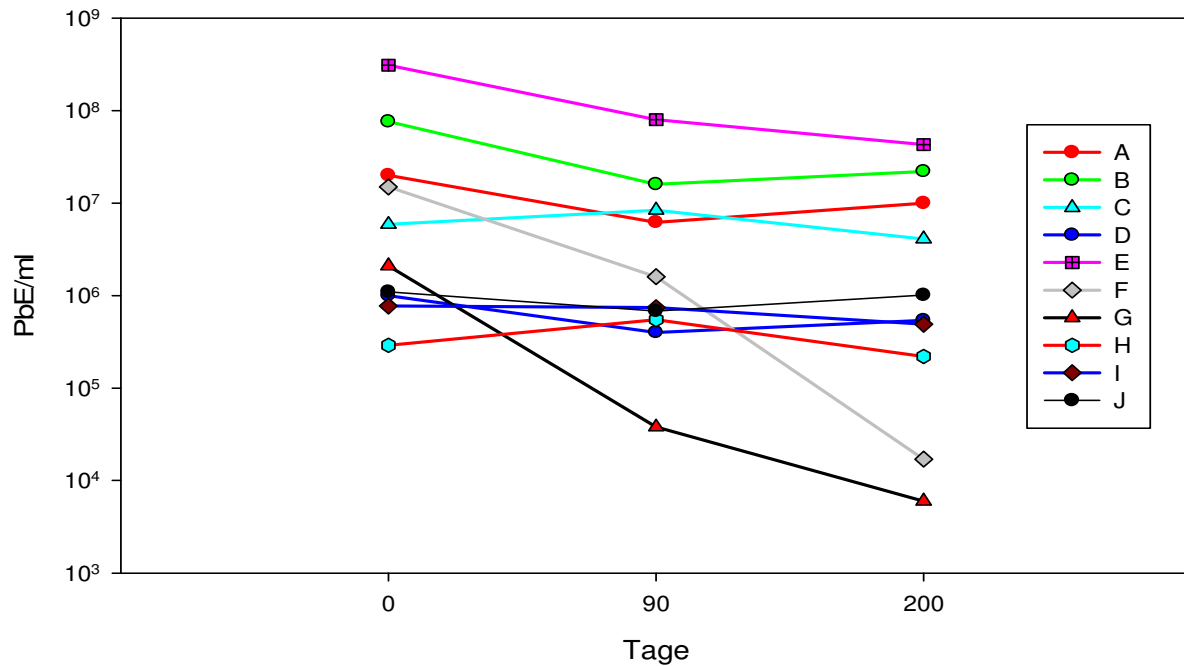


Abbildung 3.28: Stabilität von *L. lactis* Phagen in den Salzbad-Rückstellproben A-J über einen 3-monatigen Zeitraum bei Raumtemperatur.

Der Phagentiter verringerte sich in den Salzbadproben während der Lagerung bei Raumtemperatur um max. 3 log-Stufen (Abbildung 3.28). Nach dieser Lagerzeit wurden aus den Salzbadproben die Phagen mit den entsprechenden Indikatorstämmen isoliert und deren Hitzestabilität im Suspensionsmedium Wasser überprüft. Der Vergleich der Inaktivierungsergebnisse für die Phagen vor und nach der Lagerung ist in der Tabelle 3.12 zusammengefasst. Es ergab sich keine Veränderung hinsichtlich einer erhöhten Thermostabilität bei den untersuchten Phagen. Nach der Lagerung waren die gleichen Temperaturen zur vollständigen Inaktivierung (5 min Erhitzungsdauer) ausreichend wie vor der Lagerung.

Tabelle 3.12: Erforderliche Temperatur zur vollständigen 5-minütigen Inaktivierung von „Salzbad“-Phagenisolaten, die vor und nach einer 3-monatigen Lagerung der Salzbadproben bei Raumtemperatur isoliert worden waren.

Salzbad	Probe	Indikatorstamm	vor Lagerung	nach Lagerung
A	12.1	12.4Lc15	80 °C	80 °C
B	18.6	11.4Lc2	80 °C	80 °C
C	19.1	6.3Lc15	80 °C	80 °C
D	20.9	15.2Lc1	95 °C	95 °C
E	20.9	15.2Lc14	85 °C	85 °C
F	21.1	11.1Lc8	80 °C	80 °C
G	22.1	7.5Lc6	85 °C	85 °C
H	22.1	8.3Lc1	80 °C	80 °C
I	23.1	5.2Lc5	80 °C	80 °C
J	23.1	5.4Lc1	85 °C	85 °C

3.4.2 Trockenheit

Das Trockenfallen von phagenhaltigen Milchresten ist in milchverarbeitenden Betrieben ein denkbares Ereignis. Daher sollte untersucht werden, ob aus dem wiederholten Eintrocknen und Resuspendieren von phagenhaltigen Milchproben eine erhöhte Thermostabilität resultieren kann.

Tabelle 3.13: Thermische Inaktivierung der *L. lactis* Phagen während 10 Zyklen: Eintrocknung/erneute Resuspendierung in Magermilch.

Phage	Inaktivierungs- temp. (1 min)	log-Reduktion (N/N ₀) des Phagentiters nach 1 min Erhitzung in Magermilch			
		vor Trocknung	nach 3. Trocknung	nach 6. Trocknung	nach 10. Trocknung
BK5-T	60 °C	-8,2	-6,5	-6,8	-5,3
P001	75 °C	-8	-8,7	-8,2	-8,4
P008	80 °C	-7,6	-8,6	-8,4	-7,7
r1t	80 °C	-7	-7,3	-7,2	-8

Tabelle 3.13 fasst die Ergebnisse der thermischen Inaktivierungen der verschiedenen *L. lactis* Phagen zusammen. Von den vier geprüften Phagen wurde für den Phagen BK5-T eine Erhöhung der Hitzestabilität im Verlauf der Trocknungszyklen dokumentiert. Dieser sehr hitzesensitive Phage (1-minütige Inaktivierungstemperatur: 60 °C; Tabelle 3.8) überlebte bereits nach der 3. Trocknungspassage die ursprüngliche Inaktivierungstemperatur und wurde auch im weiteren Verlauf bei dieser Temperatur nicht mehr vollständig inaktiviert.

Zur Überprüfung, ob sich die Veränderung der Hitzestabilität auch in einer Veränderung auf DNA-Ebene widerspiegelt, wurden DNA-Präparationen des BK5-T Phagen vor und nach der 10. Trocknung angefertigt. Die unterschiedlichen Restriktionsverdau in Abbildung 3.29 zeigten deutlich, dass die DNA des Phagen BK5-T während der 10 Trocknungszyklen eine Deletion erfahren hatte. Dies wurde ebenfalls durch den Vergleich der Genomgrößen der beiden BK5-T-Derivate mittels

PFGE bestätigt (Abbildung 3.30). Durch den Vergleich der Restriktionsprofile in Abbildung 3.29 wurde festgestellt, dass die Deletion innerhalb des Genombereichs von 22 kb – 30 kb stattgefunden hat (Tabelle 3.14).

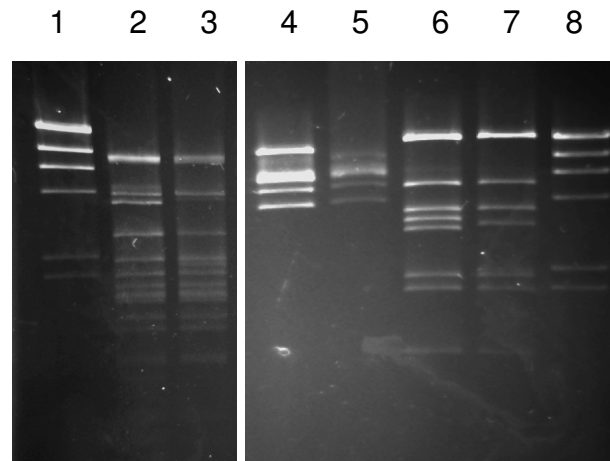


Abbildung 3.29: Restriktionsverdau der DNA des *L. lactis* BK5-T Phagen vor der Trocknung (Bahnen 2, 4 und 6) und nach der 10. Trocknung (Bahnen 3, 5 und 7). Die DNA wurde mit HindIII (Bahnen 2 und 3), EcoRI (Bahnen 4 und 5) und EcoRV (Bahnen 6 und 7) geschnitten. Als Größenreferenz wurde HindIII geschnittene DNA des Phagen Lambda verwendet (Bahnen 1 und 8).

Tabelle 3.14: Deletionsbereich der DNA des Phagen BK5-T nach der 10. Trocknung

verwendetes Restriktionsenzym	fehlende/veränderte Fragmente	Sequenzbereich (Mahanivong <i>et al.</i>, 2001)
HindIII	Fragment 3	26415 – 30159
EcoRV	Fragment 4	26040 – 29470
	Fragment 5	22917 – 26039
EcoRI	Fragment 1	22661 – 33875

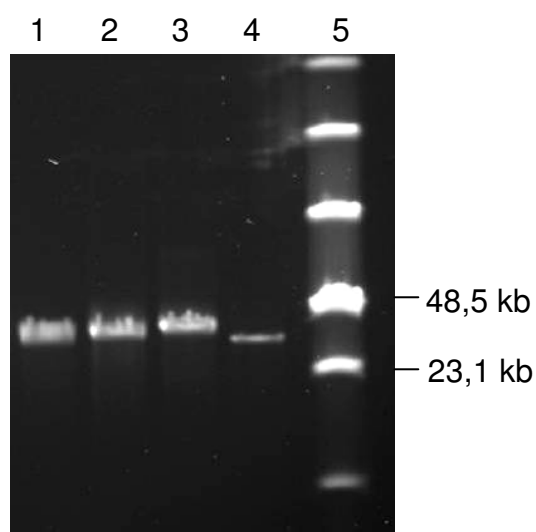


Abbildung 3.30: Pulsfeld-Gelelektrophorese der ungeschnittenen DNAs der Phagen P335 (Bahn 1), TP901-1 (2), BK5-T vor der Trocknung (3) und BK5-T nach der 10. Trocknung (4). Als Größenreferenz wurde der Low Range PFG Marker (NEB) verwendet (5). Genomgröße TP901-1: 38,4 kb und BK5-T vor der Trocknung: 40 kb.

3.4.3 Hitze

Zur Überprüfung, ob eine wiederholte Erhitzung von Phagen eine Auswirkung auf deren Hitzestabilität hat, wurde der *L. lactis* Phage P001 (mit mäßiger Hitzestabilität) über insgesamt zehn Zyklen erhitzt und anschließend vermehrt. Um die Hitzestabilität der P001-Derivate nach den Hitzestresszyklen zu überprüfen, wurden diese in Wasser suspendiert und wie oben beschrieben für 20 min erhitzt. Abbildung 3.31 zeigt deutlich, dass der Phage P001 und der Phage P001^k eine deutlich geringere Hitzeresistenz aufweisen, als der Phage P001^h.

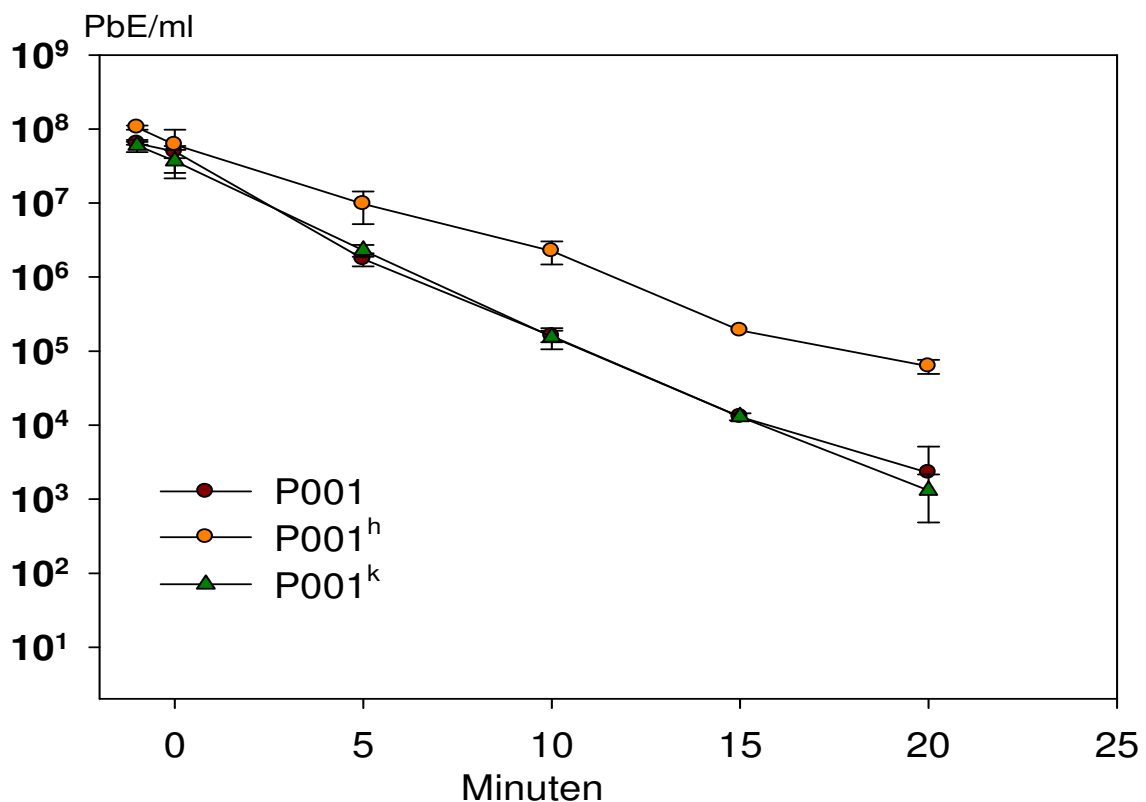


Abbildung 3.31: Vergleich der Inaktivierung der Hitzestressderivate des *L. lactis* Phagen P001 mit dem Wildtypphagen P001 bei 65 °C in Wasser. n = 2

Die DNA-Analyse der P001-Derivate ergab deutliche Unterschiede im Restriktionsprofil. Dem P001^h Phagengenom fehlten, im Vergleich zum Phagen P001, im HpaII-Verdau zwei Fragmente (1,4 kb und 1,2 kb). Der Phage P001^k zeigte diese beiden Fragmente nur sehr schwach (Abbildung 3.32).

Um Mischpopulationen auszuschließen, wurden von den P001-Derivaten jeweils zehn Einzelplaqueisolate angefertigt und deren DNA analysiert. Von den P001

Phagen zeigten alle Einzelplaqueisolate das typische HpaII-Restriktionsprofil, von den zehn Isolaten des Phagen P001^k hingegen wiesen drei Isolate das Muster mit den fehlenden Banden auf. Bei den P001^h-Isolaten zeigte nur eines das vollständige Muster, bei allen anderen fehlten die beiden Banden.

Die Hitzeresistenz wurde für einige der P001-Einzelplaqueisolate nochmals geprüft. Wie in Abbildung 3.33 ersichtlich, zeigten die Isolate des Phagen P001^h eine höhere Resistenz als die Isolate der Phagen P001 und P001^k, dies jedoch unabhängig vom Restriktionsprofil (Abbildung 3.34).

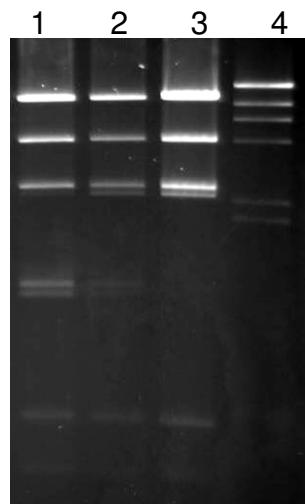


Abbildung 3.32: Restriktionsverdau der DNA des *L. lactis* Phagen P001 (Bahn 1), P001^k (Bahn 2) und P001^h (Bahn 3). Die DNA wurde mit HpaII geschnitten. Als Größenreferenz wurde HindIII geschnittene DNA des Phagen Lambda verwendet (Bahn 4).

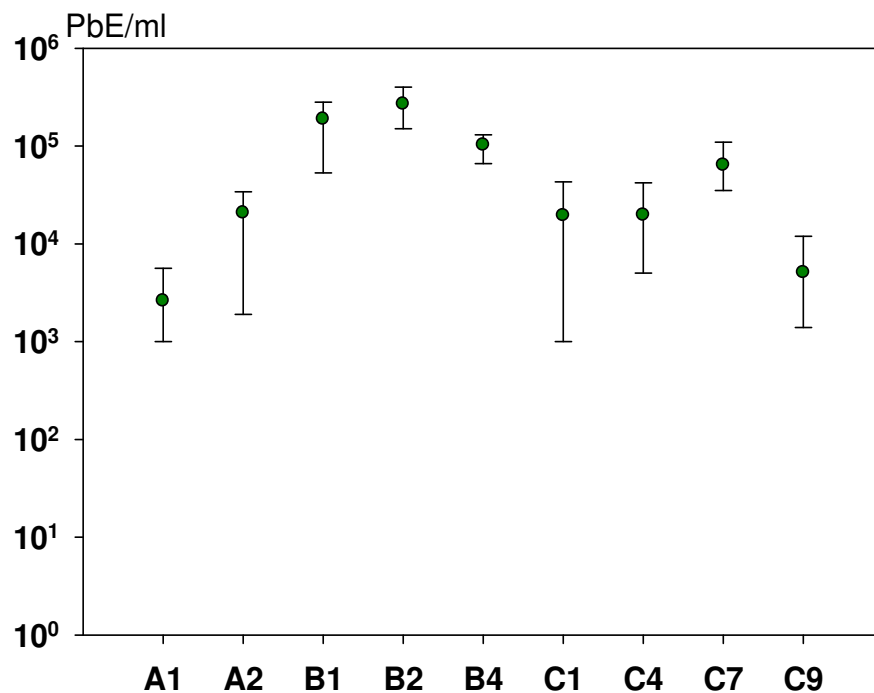


Abbildung 3.33: Resttiter nach Inaktivierung der Einzelplaqueisolate der P001 Hitzestessderivate für 15 min bei 65 °C in Wasser. A1 und A2: Einzelplaqueisolate des Phagen P001; B1, B2 und B4: Einzelplaqueisolate des Phagen P001^h; C1, C4, C7 und C9: Einzelplaqueisolate des Phagen P001^k. Der Ausgangstiter lag zwischen 1×10^8 und 4×10^8 PbE/ml. $n = 3$

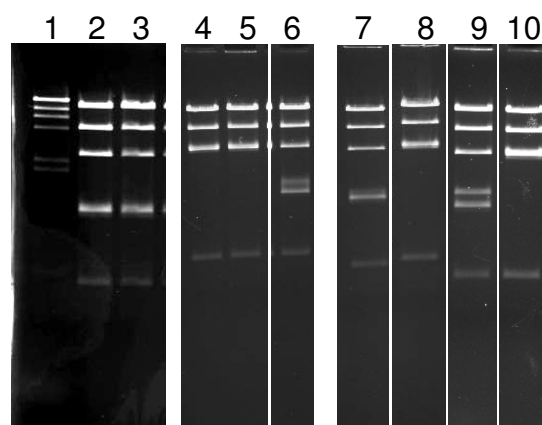


Abbildung 3.34: Restriktionsverdau der DNA der Einzelplaqueisolate des *L. lactis* Phagen P001. A1 und A2 (Bahnen 2 und 3) Einzelplaqueisolate des *L. lactis* Phagen P001; B1, B2 und B4 (Bahnen 4, 5 und 6) Einzelplaqueisolate des Phagen P001^h; C1, C4, C7 und C9 (Bahnen 7, 8, 9 und 10) Einzelplaqueisolate des Phagen P001^k. Die DNA wurde mit HpaII geschnitten. Als Größenreferenz wurde HindIII geschnittene DNA des Phagen Lambda verwendet (Bahn 1).

3.5 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Phageninaktivierung in unterschiedlichen Suspensionsmedien

Für die Erhitzungsversuche in unterschiedlichen Suspensionsmedien wurden die beiden *L. lactis* Phagen P008 (mit mäßiger Hitzestabilität) und P680 (mit hoher Hitzestabilität) über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und konzentriert. Der Phage P008 wurde von Frau Dr. Müller-Merbach (Universität Hohenheim) in den verschiedenen Suspensionsmedien erhitzt. Tabelle 3.15 zeigt die log-Reduktion der Phagentiter die in den untersuchten, erhitzten Phagensuspensionen dokumentiert wurden.

Tabelle 3.15: Reduktion des Phagentiters ($\log(N/N_0)$) bei der Erhitzung der *L. lactis* Phagen P008 und P680 in den verschiedenen Suspensionsmedien

	P008 (70 °C, 10 min)	P680 (85 °C, 10 min)
deion. Wasser	-4	-2
Nanofiltrations-Permeat	-4	-1
Ultrafiltrations-Permeat	-6	-1
CaCl ₂ (14,7 %)	-7*	-8*
NaCl (5,8 %)	-5	-0,3
NaCl (20 %)	-7*	-6
Lactose (4,7 %)	-6	-3
Glucose (2,5 %)	-6	-5
Saccharose (4,7%)	-3	-2

* vollständige Inaktivierung

Die Effekte einer 10-minütigen Erhitzung bei 70 °C auf den Phagen P008 in den verschiedenen Suspensionsmedien wird in den Abbildungen 3.35 - 3.37 gezeigt. In den unerhitzten Suspensionsproben (Kontrollen) war zwar auch schon ein niedriger Anteil an Phagen mit leeren Köpfen und rosettenförmigen Phagen-Aggregaten erkennbar, allerdings zeigten dann die erhitzten Suspensionsproben ein anderes Bild: Auffällig war der sehr hohe Anteil an disintegrierten P008 Partikeln (isolierte leere Köpfe und Schwänze). In einigen Suspensionsmedien wurde die Aggregation

der Köpfe (5,8 % NaCl) und Schwänze (NF-Permeat) dokumentiert. Viele isolierte P008-Köpfe wiesen Deformationen auf. Die in den Erhitzungsversuchen dokumentierte starke Reduktion der P008-Phagentiter in einigen Suspensionsmedien (Ultrafiltrations-Permeat, 14,7 % CaCl_2 , 5,8 % NaCl, 20 % NaCl, 4,7 % Lactose, 2,5 % Glucose) korrelierte in der TEM-Analyse auch mit der dort erkennbaren hohen Anzahl beschädigter, disintegrierter Phagenpartikel. Die TEM-Analyse der in 14,7 % CaCl_2 resuspendierten und erhitzten P008 Phagenprobe ergab ein abweichendes Bild: In diesem Medium waren keine Phagenpartikel oder isolierte P008-Schwänze mehr erkennbar – dafür wurden viele diffuse kopfartige Strukturen dokumentiert. In den erhitzten NaCl-Suspensionsproben (5,8 und 20 %) wurden auffällig wenige Phagenschwänze gefunden, und viele der isolierten Köpfe waren zu größeren Aggregaten verklumpt. Ein höherer Anteil an intakten P008-Phagenpartikeln war nur in der erhitzten Saccharoseprobe (4,7 %) erkennbar. Dieses Resultat der TEM-Analyse spiegelte somit auch die höhere Überlebensrate des P008-Phagen in diesem Medium wider.

Für den hitzestabilen P680-Phagen konnte im TEM ein anderes Bild dokumentiert werden. Obwohl dieser Phage in den Erhitzungsversuchen bei einer 15 °C höheren Temperatur erhitzt wurde, konnten im Vergleich zu den P008-Proben für diesen Phagen deutlich mehr intakte Phagenpartikel fotografiert werden (Abbildung 3.38 - 3.40). In 14,7 % CaCl_2 , konnten, wie zuvor beim Phagen P008 gezeigt, keine Schwanzstrukturen in der erhitzten Probe nachgewiesen werden. Allerdings wurden hier eindeutig Phagenköpfe dokumentiert. Die 20%ige NaCl-Lösung führte ebenso zu einer massiven Zerstörung der Phagenpartikel, jedoch waren hier im Gegensatz zum Phagen P008 deutlich mehr intakte Schwanzstrukturen vorhanden. In den erhitzten Proben der beiden Zucker Lactose und Glucose wurde der Phage P680 deutlich stärker inaktiviert. Die 4,7%ige Saccharose-Lösung hingegen hatte einen stärker schützenden Effekt, so dass hier deutlich mehr intakte Phagenpartikel dokumentiert wurden. Insgesamt gesehen wiesen defekte P680 Phagen meist nur defekte Köpfe auf, die Kopf-Schwanz-Verbindung hingegen blieb stabil.

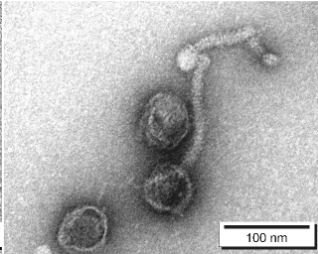
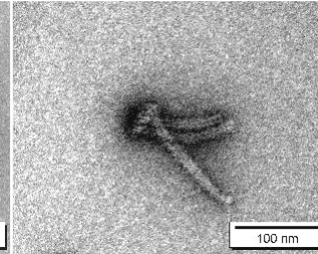
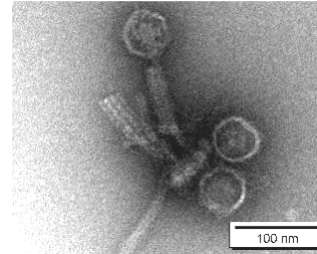
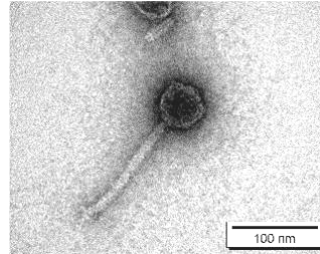
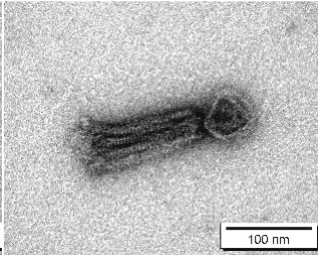
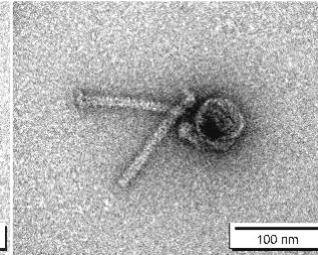
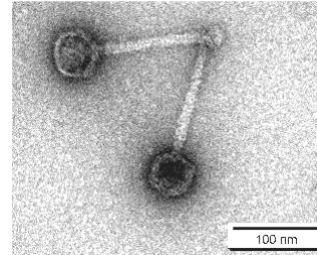
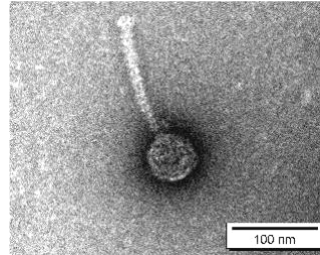
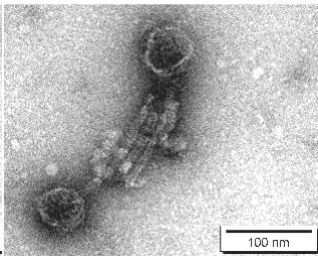
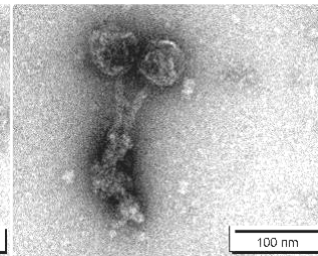
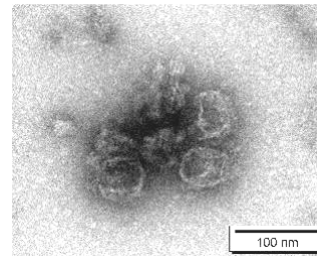
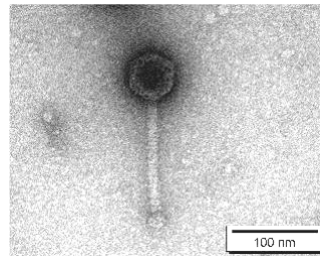
Suspensionsmedium**Kontrolle (nicht erhitzt)****Erhitzte Probe (10 min, 70 °C)****Deionisiertes
Wasser****Nanofiltrations-
Permeat****Ultrafiltrations-
Permeat**

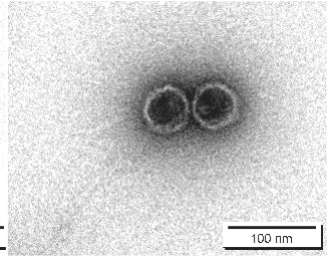
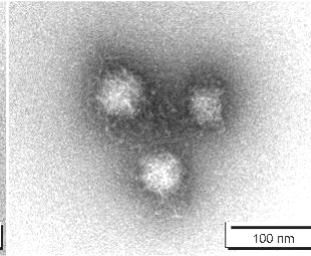
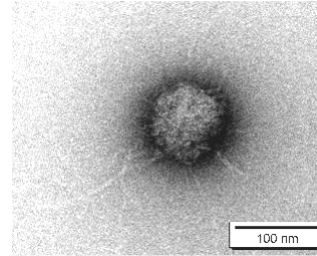
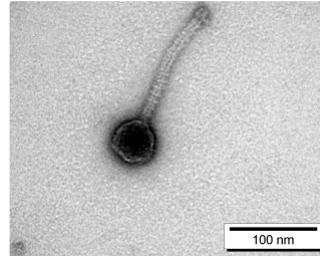
Abbildung 3.35: Elektronenoptische Aufnahmen des Phagen P008 vor und nach der Erhitzung (10 min, 70 °C) in unterschiedlichen Suspensionsmedien.

Suspensionsmedium

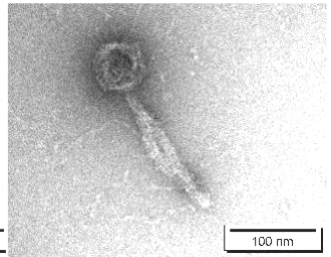
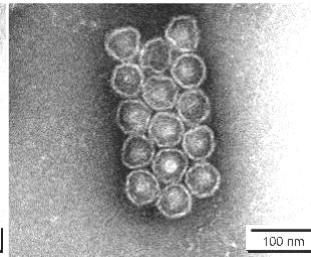
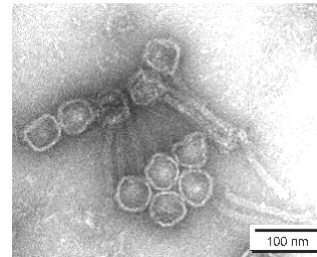
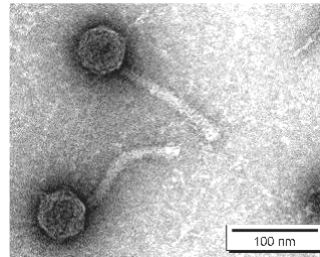
Kontrolle (nicht erhitzt)

Erhitzte Probe (10 min, 70 °C)

14,7 % CaCl₂



5,8 % NaCl



20 % NaCl

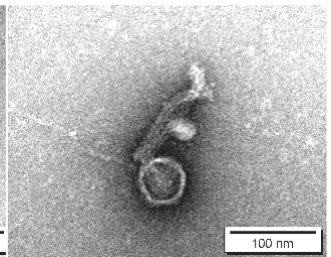
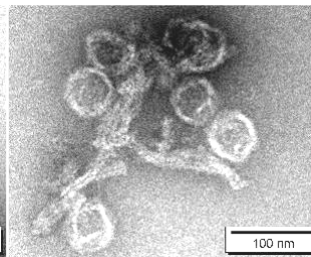
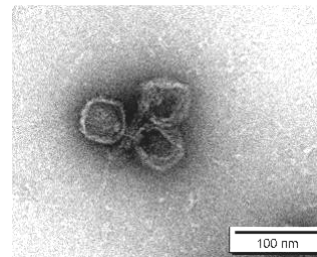
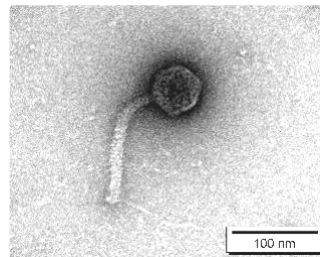


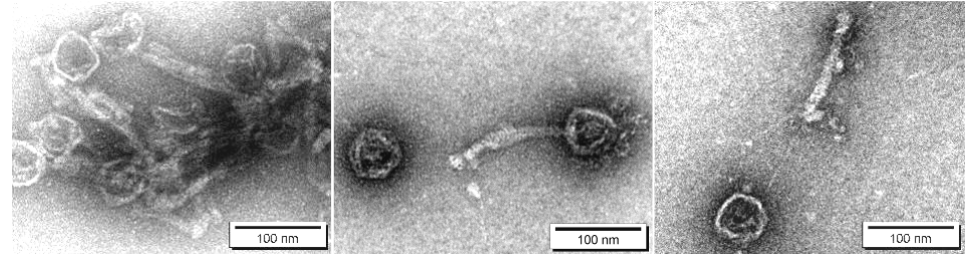
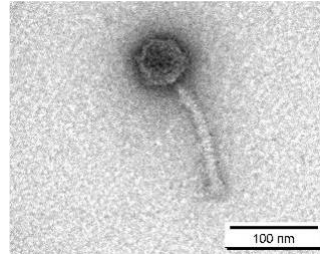
Abbildung 3.36: Elektronenoptische Aufnahmen des Phagen P008 vor und nach der Erhitzung (10 min, 70 °C) in unterschiedlichen Suspensionsmedien.

Suspensionsmedium

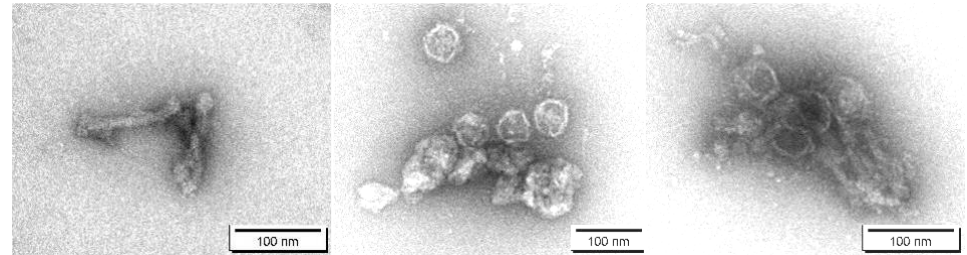
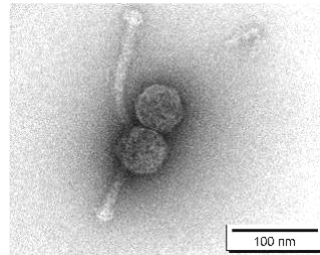
Kontrolle (nicht erhitzt)

Erhitzte Probe (10 min, 70 °C)

Lactose (4,7 %)



Glucose (2,5 %)



Saccharose (4,7 %)

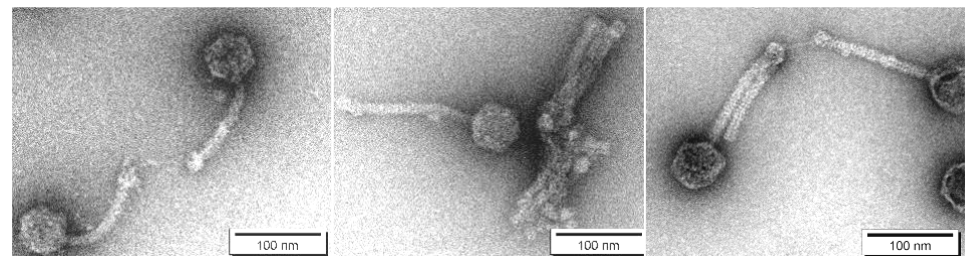
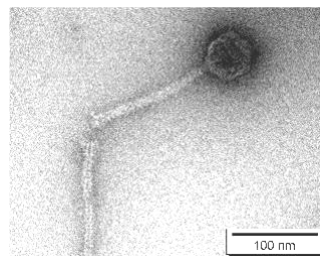


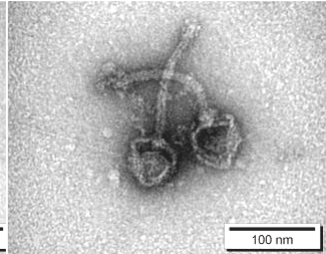
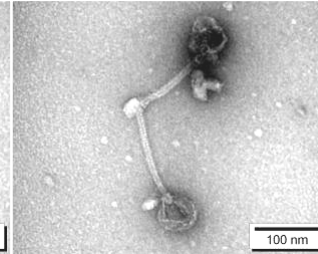
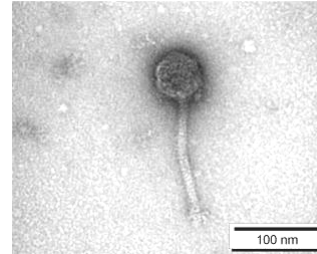
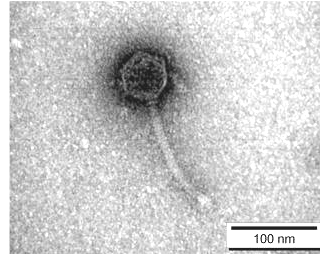
Abbildung 3.37: Elektronenoptische Aufnahmen des Phagen P008 vor und nach der Erhitzung (10 min, 70 °C) in unterschiedlichen Suspensionsmedien.

Suspensionsmedium

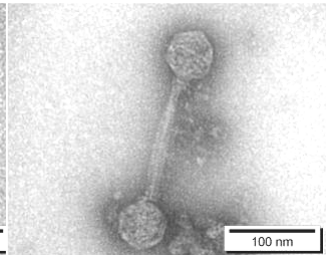
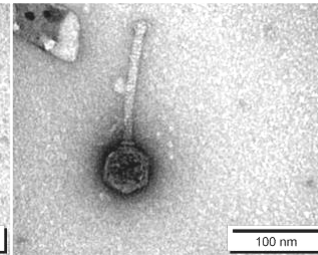
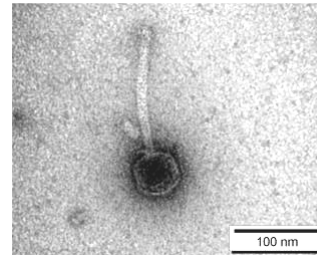
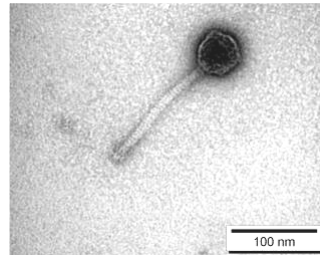
Kontrolle (nicht erhitzt)

Erhitzte Probe (10 min, 85 °C)

**Deionisiertes
Wasser**



**Nanofiltrations-
Permeat**



**Ultrafiltrations-
Permeat**

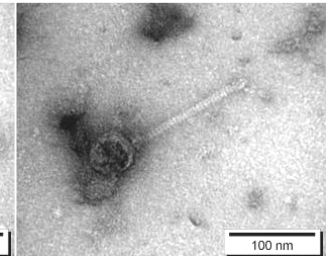
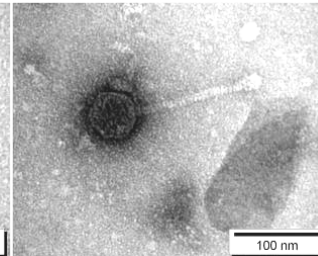
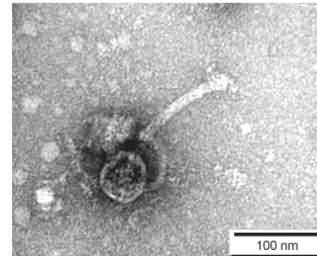
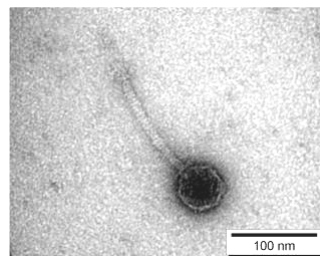


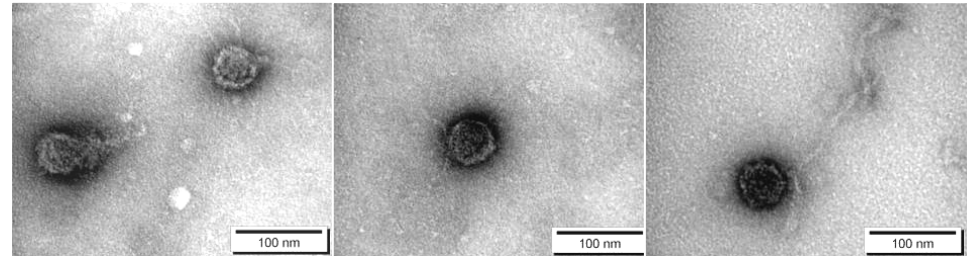
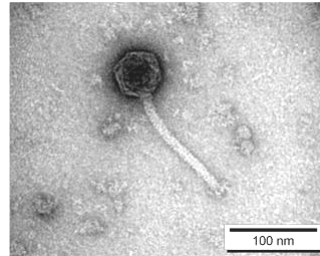
Abbildung 3.38: Elektronenoptische Aufnahmen des Phagen P680 vor und nach der Erhitzung (10 min, 85 °C) in unterschiedlichen Suspensionsmedien.

Suspensionsmedium

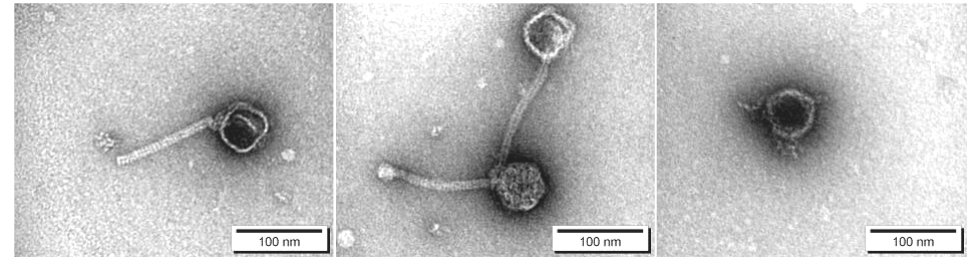
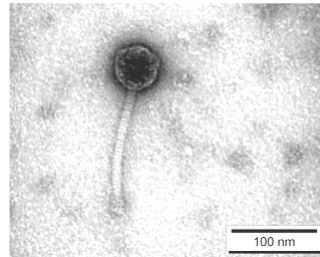
Kontrolle (nicht erhitzt)

Erhitzte Probe (10 min, 85 °C)

14,7 % CaCl₂



5,8 % NaCl



20 % NaCl

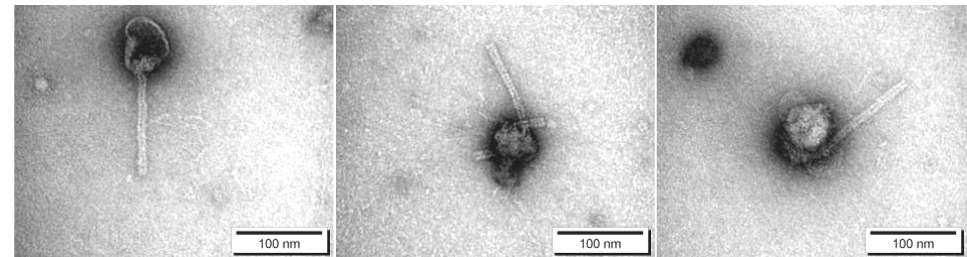
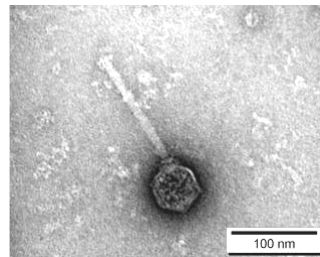


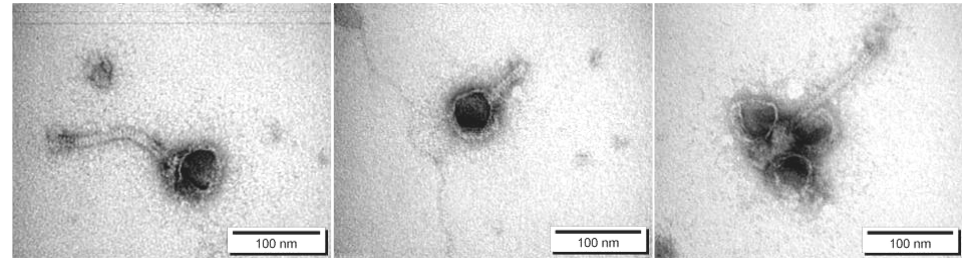
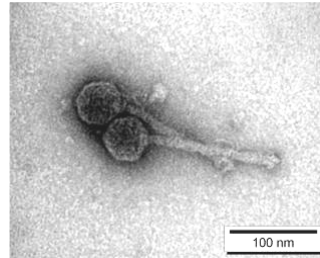
Abbildung 3.39: Elektronenoptische Aufnahmen des Phagen P680 vor und nach der Erhitzung (10 min, 85 °C) in unterschiedlichen Suspensionsmedien.

Suspensionsmedium

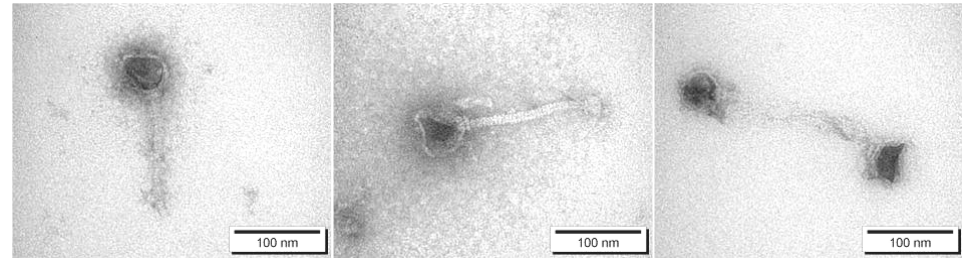
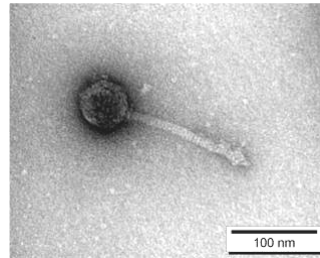
Kontrolle (nicht erhitzt)

Erhitzte Probe (10 min, 85 °C)

Lactose (4,7 %)



Saccharose (4,7 %)



Glucose (2,5 %)

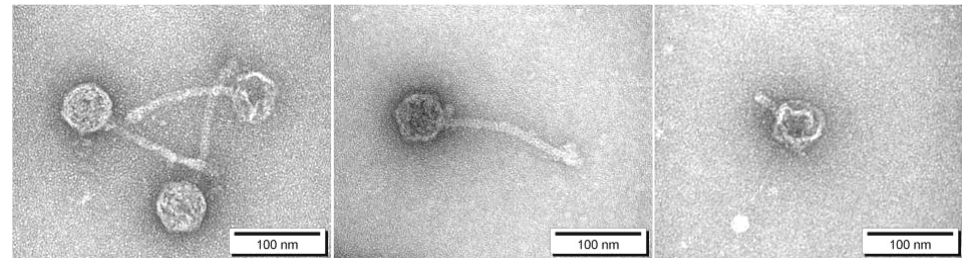
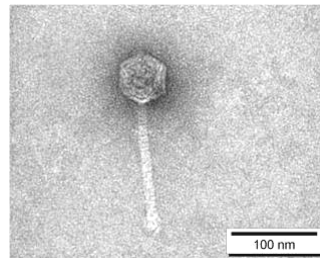


Abbildung 3.40: Elektronenoptische Aufnahmen des Phagen P680 vor und nach der Erhitzung (10 min, 85 °C) in unterschiedlichen Suspensionsmedien.

4 Diskussion

4.2 Phagenmonitoring

4.2.1 Probenerhebung

In dieser Arbeit wurde ein umfangreiches Phagenmonitoring durchgeführt, an dem insgesamt 19 Molkereien teilnahmen. Eine Besonderheit hierbei war, dass klar zwischen Großbetrieben und KMU unterschieden werden konnte. KMU werden definiert als Unternehmen, „die weniger als 250 Personen beschäftigen und die entweder einen Jahresumsatz von höchstens 50 Mio. EUR erzielen oder deren Jahresbilanzsumme sich auf höchstens 43 Mio. EUR beläuft.“ (Europäische Gemeinschaften, 2006). Demzufolge nahmen elf Großbetriebe und acht KMU am Phagenmonitoring teil. Während in ca. 50 % der Großbetriebe Phagen nachgewiesen wurden, waren sämtliche KMU mit Phagen belastet. Dieses Ergebnis spiegelt eine deutlich höhere Phagensicherheit der Großbetriebe gegenüber den KMU wider. Die Betriebe reichten insgesamt ein sehr großes Spektrum an Proben ein (Tabelle 7.1). In den Großbetrieben wurden in 62 % der Molkeproben Phagen nachgewiesen, in KMU hingegen in 78 % der Proben. Frischkäse- und Käseproben waren zu 20 % in den Großbetrieben phagenpositiv, in den KMU allerdings zu 80 %. Ein etwas anderes Bild ergab sich bei den Salzbadproben, hier wurden in sämtlichen Proben beider Unternehmensformen Phagen nachgewiesen. Dass Phagen weltweit häufig in Molkereiprobe nachzuweisen sind, wurde in einer Vielzahl von Studien bestätigt (Hammer & Babel, 1943; Whitehead & Hunter, 1945; Chopin *et al.*, 1976; Bhimani & Freitas, 1993; Casey *et al.*, 1993; Neve *et al.*, 1994; Moineau *et al.*, 1996; Suarez *et al.*, 2002; Madera *et al.*, 2004), aber bisher wurde hierbei keine Differenzierung hinsichtlich der Betriebsform getroffen. Aus den hier gewonnenen Daten lässt sich ableiten, dass Großunternehmen mehr in das Thema Phagen investieren und dies in einer höheren Phagensicherheit resultiert.

4.2.2 Phagennachweis

Der Phagennachweis mittels Säuerungshemmtest stellt ein sehr flexibles und empfindliches Verfahren dar (Krusch, 1979; Svensson & Christiansson, 1991). Es können Phagen ab einem Titer von ca. 10^2 PbE/ml nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden von den Betrieben zusätzlich zu den Molkereiprobe die jeweils verwendeten Kulturen mitgeschickt. Aus diesen Kulturen wurden Stämme isoliert und für den Säuerungshemmtest verwendet. Dies erleichterte den Phagennachweis deutlich, da die Wahrscheinlichkeit, den jeweiligen Wirtstamm zur Verfügung zu haben, erhöht wurde. Zusätzlich war es das Ziel, die Phagen zu isolieren, zu charakterisieren und deren Hitzestabilität zu untersuchen. Mit Hilfe des Wirtstamms war dies möglich, ebenso wie die Bestimmung des Phagentiters in den Proben.

4.2.3 Phagencharakterisierung

Innerhalb des Phagenmonitorings wurde der Nachweis von Phagen auf die Wirtspezies *L. lactis* und *S. thermophilus* begrenzt. Die Phagen wurden zunächst morphologisch im Elektronenmikroskop untersucht. Dabei ließ sich die Mehrzahl der *L. lactis* Phagen den prolaten Phagen mit langgestreckten Köpfen und den Phagen mit isodiametrischen Köpfen und Schwänzen von 140 nm bis 160 nm Länge zuordnen (Übersicht der *L. lactis* Phagenspezies: Abbildung 1.1). Der *L. lactis* Phagentaxonomie entsprechend, sind diese isodiametrischen Phagen Vertreter der c2- / Q54-Phagenspezies (prolate Köpfe, kurze Schwänze), der 936-Phagenspezies (Schwanzlänge: ca. 160 nm) und der P335[r1t]-Phagenspezies (Schwanzlänge: ca. 140 nm). Diese Morphologien von *L. lactis* Phagen sind schon seit langem weltweit in Molkereien beschrieben worden (Jarvis, 1984; Coveney *et al.*, 1987; Braun *et al.*, 1989; Moineau *et al.*, 1996; Madera *et al.*, 2004). Durch PCR-Untersuchung konnten die *L. lactis* Phagen der 936- und c2-Spezies eindeutig identifiziert werden, da deren Genome hochkonservierte DNA-Abschnitte als Zielregionen für die PCR beinhalten (Labrie & Moineau, 2000). Für die *L. lactis* Phagen der P335-Spezies existiert eine solche DNA-Region für die PCR nicht (Deveau *et al.*, 2006). P335-Phagen umfassen Phagen unterschiedlicher Morphologien. Die TP901-1-Phagen und BK5-T-Phagen der P335-Gruppe sind morphologisch gut zu unterscheiden, während die r1t-Phagen dieser Gruppe den 936-Phagen ähnlich sind (Abbildung 1.1). Daher wurden zur genaueren Unterscheidung dieser Spezies DNA/DNA-Hybridisierungen durchgeführt. Mit dieser Methode wurden die Ergebnisse der PCR nochmals bestätigt und zwei

Isolate der P335[r1t]-Spezies zugeordnet (P643 und P644). Das in den letzten Jahrzehnten vermehrte Auftreten von *L. lactis* Phagen der P335-Spezies (Josephsen *et al.*, 1994; Neve *et al.*, 1994; Moineau *et al.*, 1996; Durmaz & Klaenhammer, 2000) konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Der isodiametrische Phage P682 (Abbildung 3.2) wies eine Schwanzlänge von 210 nm auf und ließ sich morphologisch nicht in das derzeitige Phagenspezies-Schema einordnen. Die PCR-Untersuchung und DNA/DNA-Hybridisierungen ordneten diesen Phagen jedoch eindeutig der 936-Spezies zu. Es wurden in anderen Studien über Phagen der 936-Spezies berichtet, die Schwanzlängen von 126 – 159 nm aufwiesen (Loof *et al.*, 1983; Coveney *et al.*, 1987; Moineau *et al.*, 1996; Deveau *et al.*, 2006), demnach ist bei diesen Phagen eine gewisse Variabilität der Schwanzlänge zu erwarten. Für den Phagen TP901-1 (P335-Spezies) wurde nachgewiesen, dass das sog. „tape measure protein“ die Schwanzlänge bestimmt und Mutationen in dem entsprechenden Gen zu Veränderungen der Schwanzlänge führen (Pedersen *et al.*, 2000; Vegge *et al.*, 2005). Die bisher sequenzierten Phagen der 936-Spezies wiesen ebenfalls ein „tape measure protein“ auf (Mahony *et al.*, 2006) und demnach ist auch bei dieser Spezies ähnliches zu erwarten wie beim Phagen TP901-1.

Für alle untersuchten *S. thermophilus* Phagen ergab sich ein einheitliches morphologisches Bild (isodiametrische Köpfe, 240 nm Schwanzlänge), wie für diese Phagengruppe in der Literatur beschrieben (Neve *et al.*, 1989). Der unterschiedliche DNA-Verpackungstyp und die darauf basierende Einteilung in *cos*- und *pac*-Typ Phagen wurde in dieser Arbeit mit Hilfe einer spezifischen PCR durchgeführt (Ali *et al.*, 2006). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Studie von LeMarrec *et al.* (1997), die 19 *cos*-Typ und elf *pac*-Typ Phagen untersucht haben und der von Quiberoni *et al.* (2006), die von sechs *cos*-Typ und vier *pac*-Typ Phagen berichteten.

Die hier untersuchten virulenten *Ln. mesenteroides* Phagen zeigten alle die gleiche Morphologie (Abbildung 3.5). Das Restriktionsprofil unterschied sich bei den Isolaten, allerdings zeigte die DNA/DNA-Hybridisierung mit einer DIG-markierten DNA-Sonde des *Ln. mesenteroides* Phagen P728 sehr deutliche Signale mit den DNAs der anderen Phagen. Demnach ist von einer hohen Verwandtschaft dieser Phagen auszugehen, was auch eine Erklärung für das einheitliche Inaktivierungsmuster sein kann.

4.3 Thermische Inaktivierung von Phagen

Ziel dieser Untersuchung war, herauszufinden, welche Temperaturen zur vollständigen Inaktivierung von Phagen nötig sind. Dabei wurde das Hauptaugenmerk weniger auf die genaue Inaktivierungskinetik gelegt, sondern der Unterschied in der Thermoresistenz zwischen den verschiedenen Phagenspezies genauer betrachtet. In bisherigen Studien wurden nur wenige Phagenisolate geprüft, oder es wurden nur Phagen einer Wirtspezies untersucht. Hier wurde erstmals die Hitzeresistenz der verschiedenen *L. lactis* Phagenspezies (mit Ausnahme der seltenen KSY1- und 1706-Spezies), von *S. thermophilus* Phagen (*pac*- und *cos*-Typ), von *Ln. mesenteroides* Phagen und von Phagen der Wirtspezies *Lb. delbrueckii* geprüft. In vielen Arbeiten wurde ein Einfluss des Suspensionsmediums auf die Hitzestabilität von Phagen festgestellt, aus diesem Grund wurden die Phagen in der vorliegenden Arbeit in drei verschiedenen Medien erhitzt (Wasser, Bouillon, Magermilch). Es wurde ein Volumen von ca. 1,5 ml Phagensuspension in einem fest verschraubten Edelstahlröhrchen erhitzt. Dabei wurde das Vorhandensein von Luftblasen bzw. Lufträumen vermieden, um eine möglichst schnelle und gleichmäßige Wärmeübertragung zu gewährleisten. Die Röhrchen wurden vollständig eingetaucht im Wasserbad erhitzt. Die Erhitzungen wurden solange mit in 5 °C-Schritten erhöhter Erhitzungstemperatur wiederholt, bis keine Phagen mehr nachweisbar waren. In anderen Studien wurden unterschiedliche Erhitzungsmethoden verwendet. Quiberoni *et al.* (2003) erhitzten die Phagensuspensionen in einem Volumen von 200 µl im Eppendorf-Reaktionsgefäß, Suarez & Reinheimer (2002) und Buzrul *et al.* (2007) in einem Volumen von 1 ml. Dabei fehlen allerdings genaue Angaben über die Erhitzungsmethode (z.B. Wasserbad) oder in welchem Umfang die Gefäße ins Wasser getaucht wurden. Andere Autoren benutzten versiegelte Ampullen (mit 1,5 – 2 ml Phagensuspension), die vollständig untergetaucht, im Wasserbad erhitzt wurden (Chopin, 1980; Koka & Mikolajc, 1967; Koka & Mikolajc, 1970). Die Methode, das Suspensionsmedium auf die entsprechende Temperatur anzuwärmen und anschließend die Phagen hinzuzugeben, wurde auch von einigen Autoren verwendet (Daoust *et al.*, 1965; Zottola & Marth, 1966). Von Wilkowske *et al.* (1954) und Zottola & Marth (1966) wurden ebenfalls wie hier Schraubverschluß-Röhrchen verwendet, allerdings mit einem größeren Volumen (10 ml Phagensuspension in 25 ml Röhrchen). Müller-Merbach *et al.* (2005a, 2005b, 2006) haben in ihren Arbeiten das gleiche System verwendet wie in vorliegender

Arbeit, was die Ergebnisse vergleichbar macht. Bei den anderen Studien lassen sich aufgrund der methodischen Unterschiede nur Abschätzungen über generelle Aussagen treffen.

4.3.1 *L. lactis* Phagen

Betrachtet man die Erhitzungsdaten, so wird sofort die hohe Variabilität der Hitzeresistenz, insbesondere in Abhängigkeit von der jeweiligen Phagenspezies, deutlich. Es ließen sich hierbei ganz klar thermosensible Phagenspezies ausmachen (BK5-T-Phagen, ca 240 nm Taillänge und 949-Phagen, ca 500 nm Taillänge), sowie Phagenspezies mit weitaus höherer Thermostabilität (Abbildung 4.1). Wilkowske *et al.* (1954), Chopin (1980) und Suarez & Reinheimer (2002) berichteten ebenfalls über eine hohe Variabilität der Hitzeresistenz der untersuchten Phagenisolate. Es wurde jedoch keine Aussage über die Spezies der untersuchten Phagen getroffen. Es ist davon auszugehen, dass diese Phagen zu den weltweit am häufigsten vorkommenden Phagen der 936-, c2- und P335-Spezies zu zählen sind. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde ein sehr breites Inaktivierungsspektrum dieser Phagengruppen festgestellt, wobei sich Phagen der 936-Spezies als hitzeresistenter herausgestellt hatten. Madera *et al.* (2004) und Müller-Merbach *et al.* (2005b) berichteten ebenfalls über eine höhere Thermoresistenz von Phagen der 936-Spezies gegenüber Phagen der c2- und P335-Spezies. Die in der Studie von Müller-Merbach & Hinrichs (2006) untersuchten Phagen stammten aus dem Phagenmonitoring der vorliegenden Arbeit und ergaben ebenfalls ein sehr breites Inaktivierungsmuster. Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Daten ließen sich die Phagen ihren jeweiligen Spezies zuordnen und somit wurde auch hier die höhere Thermostabilität von Phagen der 936-Spezies gegenüber der c2-Spezies bestätigt (Tabelle 4.1). Der Einfluss des Suspensionsmediums konnte für die untersuchten Phagen nicht eindeutig geklärt werden. In einigen Studien konnte ein schützender Effekt von Milch auf die Phagenstabilität bei Hitze beschrieben werden (Koka & Mikolajc, 1967; Müller-Merbach *et al.*, 2005a), jedoch konnte dieser hier nur bei einigen Phagen beobachtet werden (P034, P369, P4565, P680; P570). Andere Phagen wiesen in den Suspensionsmedien Wasser und Magermilch eine höhere Stabilität auf, bei den meisten konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden. Für den Phagen P008 (936-Spezies) wurde in einer früheren Studie ein Schutzeffekt von Milch beschrieben (Müller-Merbach *et al.*, 2005a), dieser konnte hier allerdings

nicht bestätigt werden. Der Grund hierfür liegt in den unterschiedlichen Erhitzungsparametern, die hier weniger gut geeignet waren, um solche Unterschiede deutlich darzustellen.

4.3.2 *S. thermophilus* Phagen

Bei *S. thermophilus* Phagen handelt es sich um eine sehr homogene Phagengruppe mit gleicher Morphologie und genetischer Verwandtschaft. Sie lassen sie anhand ihres DNA-Verpackungsmechanismus in *cos*- und *pac*-Typ Phagen einteilen (Neve *et al.*, 1989; LeMarrec *et al.*, 1997). Da sich die Strukturproteine dieser beiden Phagentypen unterscheiden, wurde geprüft, ob Unterschiede bzgl. der Thermoresistenz dieser beiden Phagentypen bestehen. Die untersuchten *S. thermophilus* Phagen (*cos*- und *pac*-Typ) zeigten keine extreme Variabilität der Hitzeresistenz, es waren allerdings Temperaturen von 70 – 80 °C zur vollständigen Inaktivierung nötig. Diese relativ geringen Unterschiede wurden auch für fünf argentinische *S. thermophilus* Phagen festgestellt, wobei dort drei Phagenisolate bei 72 °C (45 min) nur sehr gering inaktiviert wurden, während zwei Phagenisolate eine höhere Inaktivierung erfuhren (Binetti & Reinheimer, 2000). Auch hinsichtlich des Suspensionsmediums wurde bei den Phagen, die in verschiedenen Medien erhitzt wurden, kein Unterschied festgestellt, was wiederum die Ergebnisse von Binetti & Reinheimer (2000) bestätigt.

4.3.3 *Ln. mesenteroides* Phagen

Für *Ln. mesenteroides* Phagen sind bisher keine Daten über deren Hitzestabilität publiziert worden. Vier der getesteten Phagen waren erst nach 1 min bei 85 °C nicht mehr nachweisbar, wodurch diese Phagen zu den hitzestabileren Phagen zu zählen sind. Allerdings wurde der Phage P4556 nach 1 min bei 80 °C inaktiviert, was wiederum eine gewisse Variabilität der Hitzeresistenz auch für *Leuconostoc* Phagen erwarten lässt. Zudem ergab sich bei den hier getesteten Phagen eine starke Abhängigkeit der Thermostabilität vom Suspensionsmedium. Am geringsten war diese, wenn die Phagen in Wasser suspendiert wurden. In Magermilch war die Resistenz deutlich höher. Somit wurde in Magermilch für diese Phagen eine signifikante Stabilisierung bei der thermischen Inaktivierung gezeigt. Die hier untersuchten Phagen wurden in einem Betrieb isoliert und nicht weiter hinsichtlich DNA-Homologie zu anderen *Ln. mesenteroides* Phagen untersucht.

4.3.4 *Lb. delbrueckii* Phagen

Die untersuchten *Lb. delbrueckii* Phagen wurden bei 75 – 80 °C vollständig inaktiviert. In der Literatur wurde der *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* Phage Ib₃ als extrem hitzeresistent beschrieben (Quiberoni *et al.*, 2003a). In vorliegender Arbeit konnten jedoch keine Isolate mit extremer Hitzeresistenz gefunden werden. Der Phage LL-H wurde in obiger Studie ebenfalls untersucht und als temperatursensibel beschrieben, was in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bestätigt wurde. Bemerkenswert war die hohe Empfindlichkeit der Phagen gegen Hitze, wenn diese in Wasser suspendiert wurden. Der Einfluss des Suspensionsmediums wurde auch von Quiberoni *et al.* (2003a) bestätigt, allerdings wurde dort das Medium Wasser nicht verwendet. Die untersuchten Phagen verringerten ihre Infektiosität schon durch das alleinige Suspendieren in Wasser, so dass hier die Ausgangstiter um eine Zehnerpotenz reduziert wurden. Ein Grund hierfür könnte die spontane Ejektion der Phagen-DNA sein. Bei dem Phagen LL-H besteht eine Tris-induzierbare DNA-Ejektion, die durch divalente Kationen (Mg²⁺, Ca²⁺) aber nicht durch monovalente wie K⁺ oder Na⁺ verhindert werden kann (Alatossava, 1982). Die gewonnenen Phagenlysate wurden vor der Erhitzung auf einen einheitlichen Titer im jeweiligen Suspensionsmedium verdünnt, und der plötzliche Wegfall des Kationendrucks könnte die DNA-Ejektion induziert haben.

4.4 Hitzeresistenz von Phagen

4.4.1 Vergleich der thermoresistenten *L. lactis* Phagen

In den Erhitzungsexperimenten haben sich vor allem *L. lactis* Phagen der 936-Spezies als besonders hitzeresistent erwiesen. Müller-Merbach & Hinrichs (2006) haben gezeigt, dass die Phagen P1532 und P680 eine 5-minütige Erhitzung bei 90 °C in Magermilch überlebten. In der vorliegenden Arbeit waren diese Phagen und der Phage P4565 auch nach 1 min bei 100 °C noch nachweisbar. Auffällig hierbei ist der große Unterschied der Thermoresistenz zu den gut charakterisierten „Typphagen“ dieser Spezies. Die Phagen P008, 936 und sk1 wurden in den verschiedenen Suspensionsmedien nach 1 min bei 80 °C vollständig inaktiviert. Bei den hitzestabilen Phagen handelt es sich um Isolate der letzten Jahre, während die „Typphagen“ der 936-Spezies vor vielen Jahren isoliert wurden (P008: 1971; 936: 1977; sk1: 1988). Von Madera *et al.* (2004) wurde ebenfalls festgestellt, dass neue

L. lactis Phagenisolate der c2- und 936-Spezies deutlich hitzeresistenter waren, als die Referenzphagen der jeweiligen Spezies. Allerdings kann man nicht davon ausgehen, dass Phagen der 936-Spezies durch Adaptation an die Bedingungen in Molkereien eine erhöhte Hitzestabilität aufweisen. Denn wie in Abbildung 3.20 zu sehen ist, zeigten Isolate von 936-Phagen, die über einen Zeitraum von 21 Jahren aus einem Betrieb isoliert wurden, keine wesentlich höhere Hitzeresistenz. Vergleicht man die Hitzeresistenz der Phagen des aktuellen Monitorings, so werden einige Besonderheiten deutlich. Sowohl in KMU, als auch in Großbetrieben waren thermoresistente *L. lactis* Phagen vorhanden (Tabelle 4.1). Diese stellten einen signifikanten Anteil der natürlichen Phagenpopulationen dar. Sie konnten von einer Vielzahl an Produkten/Proben isoliert werden und zum Teil kamen in den Betrieben sowohl thermosensitive als auch thermoresistente Phagen vor. Hierbei überlebten die Phagen eine 5-minütige Erhitzung in Magermilch bei 80 °C, was als deutlich thermoresistenter im Vergleich zur Mehrzahl der Laktokokken-Phagen in Abbildung 4.1 anzusehen war. Dabei konnten bei den KMU 30 % der Phagen und bei den Großbetrieben 50 % der Phagen als thermoresistent angesehen werden. Wiederum dominiert die 936-Spezies bei den Phagen mit erhöhter Hitzestabilität. Der Phage P643 (P335-Spezies) war das einzige Isolat einer anderen Spezies, das nach dieser thermischen Behandlung noch nachzuweisen war. Dieser Phage weist die derzeit höchste Hitzeresistenz von Phagen der P335-Spezies auf.

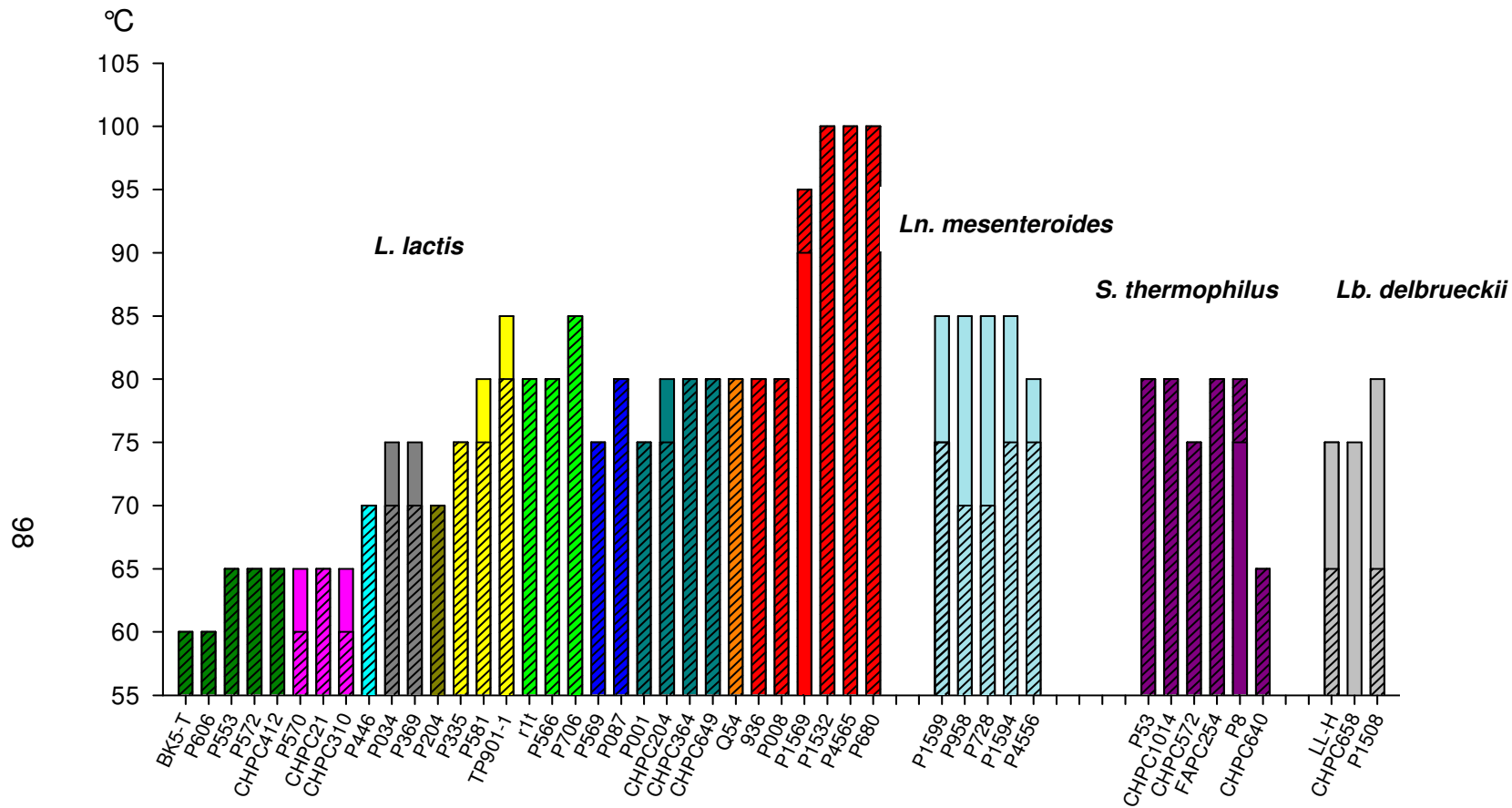


Abbildung 4.1: Übersicht der thermischen Inaktivierungen von Bakteriophagen. Der obere Rand der Balken stellt die Temperatur dar, die zur vollständigen Inaktivierung der Bakteriophagen nach 1 min Erhitzung führte. Die gestrichelten Balken stehen für die Erhitzungen in Wasser, die anderen für die Erhitzung in Magermilch. Die Phagen P1532, P4565 und P680 waren nach 1 min bei 100 °C noch in sehr geringen Resttitern nachweisbar.

Tabelle 4.1: Übersicht der thermoresistenten Phagen des Monitorings und deren Spezieszugehörigkeit (nach Müller-Merbach & Hinrichs, 2006).

Unternehmen	Phagen-Isolate ^{(a) (b)}	Phagen-Spezies
Großbetriebe		
Betrieb 2	<u>P620</u> (F), <u>P622</u> (M)	936
Betrieb 3	P653 (S), P654 (S), P655 (S)	c2
Betrieb 11	P637 (M), P645 (M), <u>P646</u> (M), <u>P647</u> (M), <u>P648</u> (M), P649 (M), P650 (S), P651 (S), <u>P652</u> (S)	936
	P635 (M), P636 (M), P638 (M)	c2
Betrieb 14	P618 (Q)	936
KMU		
Betrieb 5	<u>P680</u> (Q), P623 (S), <u>P685</u> (S)	936
	P684 (S)	c2
Betrieb 6	P624 (F), P625 (F)	c2
Betrieb 7	P626 (M), P627 (M), P628 (C), P681 (S)	936
Betrieb 8	P629 (Q), P630 (M), <u>P682</u> (S), P683 (S)	936
Betrieb 10	<u>P632</u> (M), <u>P633</u> (M), <u>P634</u> (M)	936
Betrieb 12	P639 (S), <u>P640</u> (M), <u>P641</u> (H)	936
Beitrieb 15	<u>P642</u> (M), <u>P656</u> (S), <u>P657</u> (S), <u>P671</u> (S)	936
Betrieb 17	<u>P643</u> (Q), P644 (Q)	P335
Kulturenhersteller		
	<u>P1532</u> , <u>P1569</u> , <u>P4565</u> CHPC204, CHPC364, CHPC649 CHPC21, CHPC310 CHPC412	936 c2 949 P335

^(a) Herkunft der Phagen: (F) Frischkäse, (M) Molke, (S) Salzbad, (Q) Quark, (H) Hartkäse

^(b) Thermoresistente Phagen sind fett hervorgehoben und unterstrichen.

Phage P671 wurde über 5 log-Stufen inaktiviert, war aber immer noch nachweisbar. Die Phagen CHPC21, CHPC310 und CHPC412 waren bereits nach 1 min bei 65 °C nicht mehr nachweisbar, die Phagen CHPC204, CHPC364 und CHPC649 nach 1 min bei 80 °C.

Die Herkunft der Phagen der Kulturenhersteller ist unbekannt.

In der Studie von Buzrul *et al.* (2007) wurden zehn türkische *L. lactis* Phagen auf ihre Hitzestabilität in LM17-Bouillon getestet. Bis auf zwei Phagen überlebten alle eine 15-minütige Erhitzung bei 72 °C und fünf Phagen waren nach 5 min bei 90 °C noch nachweisbar (Titer > 10 PbE/ml). Diese thermoresistenten Phagen wurden jedoch nicht weiter charakterisiert, so dass keine Aussage über deren Spezieszugehörigkeit gemacht werden kann. Allerdings wurden sämtliche Phagen, welche die 5-minütige Erhitzung bei 90 °C überlebten, aus Rohmilch isoliert, was dafür spricht, dass die Hitzeresistenz von Phagen nicht durch die Bedingungen in den Molkereien induziert wird.

Insgesamt zeigten die hitzestabilen Phagen eine sehr hohe genetische Verwandtschaft zum Typphagen der 936-Spezies. Trotz der deutlich höheren Hitzestabilität des Phagen P680 konnte kein Unterschied im Genombereich, der für die Strukturproteine kodiert, festgestellt werden. Unterschiede ergaben sich im Genombereich, der für die Replikation verantwortlich ist (Mahony *et al.*, 2006). Allerdings wurden in diesem Modul schon bei den bisher sequenzierten Phagen der 936-Spezies die größten Abweichungen auf Proteinebene gefunden, so dass man nicht direkt von einem Einfluss dieses Bereichs auf die Variabilität der Hitzestabilität von Phagen der 936-Spezies schließen kann.

Die Genomgröße kann einen entscheidenden Einfluss auf die Hitzestabilität von Phagen haben. Adams & Lark (1950) beschrieben Mutanten des Coliphagen T5, der in Citratpuffer über eine höhere Hitzestabilität verfügte als der Wildtyp-Phage. Diese Mutanten zeigten eine geringere spezifische Dichte (Hertel *et al.*, 1962) und Rubenstein (1968) zeigte, dass diese geringere Dichte mit einem Verlust von DNA zusammenhängt. Je geringer die Dichte, desto höher die Hitzeresistenz und desto größer der Verlust an DNA (Rubenstein, 1968). Bei allen oben genannten Autoren wiesen die Mutanten die erhöhte Hitzestabilität nur bei Erhitzung in Medien mit niedrigen Salzkonzentrationen (Citratpuffer) auf. Bei Erhitzung in Bouillon war kein Unterschied bzgl. der Hitzestabilität erkennbar. Für den *L. lactis* Phagen P008 (936-Spezies) wurden mittels wiederholter CsCl-Dichtegradientenzentrifugation Phagen mit geringerer spezifischer Dichte isoliert. Diese zeigten bei Erhitzung in Wasser jedoch eine verringerte Hitzestabilität im Vergleich zum Wildtyp-Phagen (Abbildung 3.23), sowie keine genomischen Veränderungen (Abbildung 3.24). Die Reduktion der Dichte der P008-Phagen von 1,41 g/ml auf 1,40 g/ml lag im selben Bereich wie für

die T5-Phagen von 1,554 g/ml auf 1,544 g/ml (Rubenstein, 1968). Eine Reduktion der Phagendichte wurde bisher nur mit Deletionen im Phagengenom in Zusammenhang gebracht, nicht jedoch mit einer Erhöhung des Proteinanteils (Rubenstein, 1968; Ritchie & Malcolm, 1970). Allerdings enthielten T5-Phagen mit erhöhter spezifischer Dichte (als der Wildtyp) nicht mehr DNA, sondern weniger Protein (Saigo, 1978).

Der Phage TP901-BC1034 ist ein Derivat des *L. lactis* Phagen TP901-1, dessen Genom ein zusätzliches DNA-Fragment beinhaltet. Auf diesem Fragment (1,1 kb) befand sich ein Gen, das für Erythromycin-Resistenz kodiert (Koch *et al.*, 1997). Der Phage TP901-1 ist ein sog. pac-Phage, der die DNA nach einem „headfull“-Mechanismus in den Kopf verpackt (Christiansen *et al.*, 1994). Hierbei wird immer etwas mehr DNA als ein komplettes Phagengenom in den Kopf verpackt, und somit wurde durch das zusätzliche Fragment beim Phagen TP901-BC1034 die DNA-Menge im Phagenkopf nicht erhöht. Die Ergebnisse der thermischen Inaktivierung (Abbildung 3.21) deuten jedoch darauf hin, dass die Insertion des DNA-Fragments eine Reduktion der Hitzestabilität zur Folge hat. Das zusätzliche Fragment wurde durch homologe Rekombination in Orf 55 in das TP901-1 Genom integriert (Koch *et al.*, 1997; Brondsted *et al.*, 2001). Dieser Genombereich trägt keine bisher bekannte Funktion. Somit sind die Genombereiche, die für die Strukturproteine des Phagen kodieren, nicht beeinflusst.

4.5 Einfluss von Stressfaktoren auf die Hitzestabilität von Phagen

4.5.1 Erhöhter Salzgehalt

Phagen können in Salzbadern über lange Zeiträume hinweg aktiv bleiben (Neve *et al.*, 2005). Hierbei wurde beobachtet, dass der Phagentiter zu Beginn stärker abnahm, um dann auf nahezu konstantem Niveau zu bleiben (Neve *et al.*, 2005). Im aktuellen Phagenmonitoring dieser Arbeit wurden in allen Salzbadproben, sowohl aus Großbetrieben als auch KMU Phagen nachgewiesen. Auch hier bestätigte sich die Langzeitstabilität der Phagen in den Salzbadproben bei Raumtemperatur (Abbildung 3.28). Bei diesen salzresistenten Phagen hatte die mehrmonatige Lagerung in Salzbadern bei Raumtemperatur allerdings keine Erhöhung der Hitzestabilität zur Folge. So waren nach der Lagerung die gleichen Temperaturen zur vollständigen Inaktivierung ausreichend wie vor der Lagerung (Tabelle 3.12).

4.5.2 Trockenheit

In Molkereien ist es vorstellbar, dass phagenhaltige Milchreste in einem kleinen Volumen eingetrocknet und zu einem späteren Zeitpunkt wieder resuspendiert werden. Phagen, die dieser Prozedur mehrmals ausgesetzt sind, könnten eine höhere Resistenz gegenüber Trockenheit aufweisen und somit eventuell auch eine höhere Hitzeresistenz besitzen. In dieser Arbeit wurden vier repräsentative *L. lactis* Phagen wiederholt in Milch eingetrocknet und resuspendiert. Einzig der temperatursensitive Phage BK5-T wies nach den Trocknungszyklen eine erhöhte Thermostabilität auf. Dieser Phage wurde auch auf genomischer Ebene untersucht, um eventuelle Rückschlüsse auf die Erhöhung der Thermostabilität schließen zu können. Es wurde durch Restriktionshydrolyse und PFGE festgestellt, dass das Genom des Phagen BK5-T eine Deletion im Sequenzbereich von 22 kb – 30 kb erfahren hat (Tabelle 3.14). Der deletierte Genomabschnitt wurde auf der Genomkarte des Phagen BK5-T (Abbildung 4.2) lokalisiert. Betroffen war eine Region des Lysogenie-Moduls vom Integrase-Gen (Orf 32) bis zum *ci*-Repressor-Gen (Orf 35), die beim Phagen BK5-T nach der 10. Trocknung nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Der Phage hat somit die Fähigkeit zur Lysogenie verloren, kann sich aber weiterhin noch virulent vermehren.

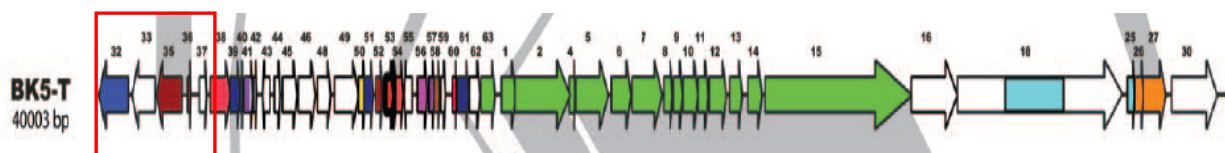


Abbildung 4.2: Genomkarte des Phagen BK5-T (Deveau *et al.*, 2006). Das rote Rechteck markiert den Deletionsbereich.

Boyce *et al.* (1995) stellten fest, dass der Phage BK5-T spontane Deletionen im Genom aufweist, wenn er über mehrere Passagen virulent vermehrt wird. Dort wurde über den Phagen BK5-T.H2Δ10 berichtet, der durch eine Deletion von ca. 3 kb ebenfalls die Fähigkeit zur Lysogenie verloren hatte. Der Stressfaktor „Trockenheit“ scheint die Selektion von BK5-T-Mutanten mit deletiertem Lysogeniemodul zu begünstigen.

4.5.3 Hitze

Hitzemutationen wurden sowohl für Bakterien (Zamenhof & Greer, 1958) als auch für Phagen beobachtet (Drake, 1966; Bingham *et al.*, 1976). Diese Mutationen (in Abwesenheit von DNA-Replikation) könnten zu einer erhöhten Hitzestabilität führen. Beim Phagen P001^h haben zehn aufeinander folgende Erhitzungszyklen zu einer erhöhten Hitzeresistenz im Vergleich zum Kontrollphagen P001^k und dem Wildtyp-Phagen P001 geführt (Abbildung 3.31). Die Genomanalyse mittels Restriktionshydrolyse ergab klare Unterschiede zwischen den verschiedenen P001-Derivaten (Abbildungen 3.32 und 3.34).

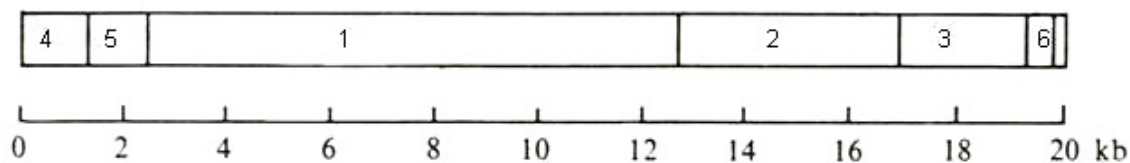


Abbildung 4.3: HpaII-Restriktionskarte des P001 Phagen-Genoms (Shearman *et al.*, 1991). Die Fragmente 1 – 6 sind in der Reihenfolge, wie sie in der Gelelektrophorese aufgetrennt werden nummeriert. Das Fragment rechts neben Fragment-6 ist in der Gelelektrophorese aufgrund der geringen Größe nicht sichtbar.

In Abbildung 4.3 ist die HpaII-Restriktionskarte des P001 Phagen-Genoms dargestellt. Das P001-Genom weist kohäsive Enden auf, welche in Abbildung 4.3 den Rändern links und rechts entsprechen. Bei Erhitzung HpaII-verdauter P001-DNA entsteht das kleine Fragment rechts neben Fragment 6 als zusätzliches, dies ist jedoch aufgrund der geringen Größe in der Gelelektrophorese nicht sichtbar. Beim Verdau der P001^h-DNA fehlten die Fragmente 4 und 5 in der Gelelektrophorese. Allerdings trat bei Erhitzung des Restriktionsansatzes ein zusätzliches Fragment von ca. 2,3 kb auf. Dies entsprach in etwa der Länge der fehlenden Fragmente, was darauf hindeutet, dass die Fragmente nicht durch eine Deletion verschwunden sind, sondern sich die Enzymschnittstellen durch kleinere Deletionen und Mutationen verändert haben. Aus diesem Grund wies das P001^h-Einzelplaqueisolat B4, trotz gleichem Restriktionsprofil wie die P001-Einzelplaqueisolate, eine höhere Thermoresistenz auf. Somit konnte die erhöhte Thermoresistenz der P001^h-Isolate nicht auf Veränderungen im Genom zurückgeführt werden. Zudem traten auch bei den P001^k-Isolaten die veränderten Restriktionsprofile auf. Da diese Phagen jedoch nicht erhitzt,

sondern nur in der gleichen Anzahl von Zyklen vermehrt wurden, scheinen die Veränderungen im Genom nicht mit den Hitzebehandlungen zusammenzuhängen.

4.6 Mechanismen der Hitzeinaktivierung von Phagen

Die Inaktivierung von Phagen kann auf die Schädigung von Proteinen und/oder DNA zurückgeführt werden (Daoust *et al.*, 1965; Koka & Mikolajc, 1967; Koka & Mikolajc, 1970; Pollard & Solosko, 1971). Bei der thermischen Inaktivierung wurde wiederholt ein sog. „Tailing“ in den Inaktivierungskinetiken beschrieben (Wilkowske *et al.*, 1954; Daoust *et al.*, 1965; Zottola & Marth, 1966; Quiberoni *et al.*, 1999b; Suarez & Reinheimer, 2002; Müller-Merbach *et al.*, 2005a) und dieses Tailing wurde mit der Denaturierung von Proteinen und DNA in Zusammenhang gebracht (Zottola & Marth, 1966). Müller-Merbach *et al.* (2005a, 2005b) haben für die *L. lactis* Phagen P008 und P001 gezeigt, dass die Aktivierungsenergien der thermischen Inaktivierung denjenigen der Proteindenaturierung entspricht, was eine proteinabhängige Phageninaktivierung wahrscheinlich macht. In der hier vorliegenden TEM-Untersuchung von erhitzten Phagensuspensionen (Abbildungen 3.35 - 3.40) konnten strukturelle Schäden an den Phagenpartikeln dokumentiert werden. Beim Phagen P008 waren die Erhitzungsbedingungen allerdings so gewählt, dass der Phagentiter um 3 – 4 log-Stufen reduziert wurde. Dadurch ließ sich aufgrund des hohen Ausmaßes an Schädigungen nicht erfassen, welches Strukturelement zuerst beeinträchtigt wurde. Beim Phagen P680 war es hingegen gut möglich, den Beginn der Inaktivierung zu beobachten. So wurden Schädigungen der Strukturproteine zuerst an der Kopf-Schwanz-Verbindung deutlich, was zu einem Abknicken oder Verlust des Schwanzes führte. Somit scheint dies die Schwachstelle des hitzestabilen Phagenpartikels zu sein, und zum Verlust der Infektiosität zu führen, vor allem weil dies auch zum Austritt der Phagen-DNA aus dem Kopf führen kann. Ähnliche Ergebnisse wurden von Moroni *et al.* (2002) für den *L. lactis* Phagen c2 veröffentlicht. Dieser wurde mittels dynamischer Hochdruckbehandlung inaktiviert und es zeigten sich Proteinschädigungen am Kopf sowie vom Kopf getrennte Schwänze. Man kann Hitzestabilität allerdings nicht mit der Phagenmorphologie korrelieren. So gehören die temperatursensiblen *L. lactis* Phagen zwar den Spezies mit den längsten Schwänzen an (949: 500 nm; BK5-T: 250 nm), andererseits sind *S. thermophilus* Phagen, trotz einer Schwanzlänge von ca. 240 nm, deutlich stabiler als BK5-T

Phagen. Zudem haben sich die *L. lactis* Phagen der P034-Spezies (extrem kurzer Schwanz) nicht als besonders hitzestabil erwiesen.

4.7 Resümee

Die Milchwirtschaft nimmt in der deutschen Ernährungsindustrie eine Spitzenstellung ein. Besonders die Produktion von Käse und Joghurt wächst stetig. Der Käsemarkt ist allerdings ein dem internationalen Wettbewerb sehr stark ausgesetzter Markt, für dessen Verteidigung erhebliche Anstrengungen notwendig sind. 2007 betrug die Käseproduktion in Deutschland 2.202.000 t. Damit ist Deutschland EU-weit an erster Stelle bei der Käseproduktion. Deutschland steht auch mit dem Export von Milchprodukten an der Spitze Europas (Milch-Industrie-Verband, 2008).

Säuerungsstörungen durch Bakteriophagen treten unvorhergesehen auf und machen den Prozess schlechter kalkulierbar. Die hohe Anzahl an phagenhaltigen Proben verdeutlicht, wie stark die Betriebe mit phagenbedingten Problemen zu kämpfen haben. Qualitätsverlust, Verzögerungen des Prozesses bis hin zum Verlust einer kompletten Charge mit entsprechenden zeitlichen und finanziellen Einbußen sind die Folge. Bei besserer Kenntnis der problemverursachenden Phagen und ihrer Inaktivierungskinetischen Daten könnte durch Auswahl geeigneter Prozessparameter die Produktionssicherheit erhöht werden. So wurde in dieser Arbeit deutlich, dass eine sehr hohe Variabilität der Hitzestabilität zwischen den verschiedenen Phagenspezies besteht und viele der untersuchten Phagen durch eine Standard-Kurzzeitpasteurisierung nicht vollständig inaktiviert werden. Allerdings stellt die Temperatur von 80 °C eine kritische Grenze dar, die in der 1-minütigen Erhitzung nur von wenigen Phagen überschritten werden kann.

5 Zusammenfassung

Bakteriophagen führen in Molkereien häufig zu Säuerungsproblemen, indem sie die bakterielle Starterkultur befallen und lysieren. In dieser Arbeit wurde im Rahmen des AiF-Projekts 1433N die Thermostabilität von Phagen verschiedener mesophiler und thermophiler Milchsäurebakterien überprüft. Um den aktuellen Phagenstatus in deutschen Molkereien zu erfassen, wurden Phagen aus insgesamt 130 Proben (Milch, Molke, Frischkäse, Käse, Joghurt, Salzbad, Reinigungslösungen) von 19 Molkereibetrieben und zwei Kulturenherstellern isoliert und elektronenmikroskopisch sowie molekularbiologisch charakterisiert. Insbesondere in den Proben von KMU wurden Phagen der Spezies 936, c2 und P335 gefunden. Das Screening der Phagenisolate ergab eine hohe Variabilität der Thermoresistenz der *L. lactis* Phagen: Vertreter der 949-Spezies und P335-Phagen des BK5-T-Typs wurden schon bei niedriger Temperatur (1 min, 60 - 65 °C) inaktiviert. Die Mehrzahl der *L. lactis* Phagen wurde bei 75 - 80 °C inaktiviert. Diese Temperaturspanne reichte auch zur Inaktivierung der Phagen der thermophilen Kulturen (*S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii*). Die isolierten *L. lactis*-Phagen mit hoher Thermoresistenz, die noch 90 – 95 °C überstanden, wurden eindeutig der 936-Spezies zugeordnet und zeigten eine hohe genetische Verwandtschaft zu den Typphagen dieser Spezies. Die Auswirkung von äußeren Stressfaktoren auf die Hitzeresistenz von Bakteriophagen wurde bei verschiedenen *L. lactis* Phagen untersucht. Eine mehrmonatige Lagerung von Phagen bei Raumtemperatur in Salzlake hatte keine Veränderung der Hitze-stabilität zur Folge. Allerdings wiesen die Phagen in Salzbadern eine ausgeprägte Langzeitstabilität auf. Eine wiederholte Eintrocknung von Phagen/Magermilch-Suspensionen führte zu einer Genomdeletion des Phagen BK5-T (P335-Spezies) und dieser wies eine erhöhte Hitzeresistenz auf. Der Phage P001 (c2-Spezies) wurde in 10 aufeinander folgenden Zyklen erhitzt und anschließend wieder vermehrt. Dieser Phage wies nach den 10 Hitzestress-Zyklen eine erhöhte Thermoresistenz auf. Der Einfluss des Suspensionsmediums für die thermische Inaktivierung wurde für die *L. lactis* Phagen P008 und P680 elektronenmikroskopisch untersucht. Bei beiden Phagen hatte die Erhitzung eine deutliche Schädigung der Phagenpartikel zur Folge, wobei der Phage P680 sich als deutlich stabiler erwies.

6 Summary

Bacteriophages lead in dairies often to fermentation failures by attacking and destroying the starter culture. In this work the thermal stability of phages of different mesophilic and thermophilic lactic acid bacteria was investigated within the AiF-Project 1433N. To determine the actual phage status in German dairies, phages from altogether 130 samples (milk, whey, fresh cheese, cheese, yoghurt, brine, cleaning solutions) of 19 dairies and 2 starter culture companies were isolated and characterized by electron microscopy and molecular biology. Especially in the samples of the SME phages of the 936-, c2- and P335-species were found. The screening of the different phages resulted in a high variability of thermal resistance within the *L. lactis* phages: Members of the 949-species and P335-phages of the BK5-T-type were already inactivated at low temperatures (1 min, 60 – 65 °C). The majority of the *L. lactis* phages were inactivated at 75 – 80 °C. This temperature range was also sufficient for the inactivation of the phages of the thermophilic cultures (*S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii*). The *L. lactis* phages with high thermal resistance, which survived 90 – 95 °C were definitely assigned to the 936-species and showed a high genetic relationship to the type-phages of this species. The impact of stress factors on the heat resistance of phages was investigated with different *L. lactis* phages. A storage of phages in brine at room temperature for several months had no effect on the thermal stability. However the phages showed a remarkable long term stability in brine. A repeated drying of phage/milk-suspensions led to a genome-deletion of the phage BK5-T (P335-species) and this one showed an elevated thermal resistance. The phage P001 (c2-species) was heated and subsequently propagated in 10 consecutive cycles. This phage showed after the 10 heat-stress cycles a higher thermal stability. The influence of the suspension media on the thermal inactivation was investigated by electron microscopy for the *L. lactis* phages P008 and P680. For both phages the heat resulted in a considerable damage of the phage particles, whereby the phage P680 was obviously more stable.

7 Anhang

Tabelle 7.1: Anzahl der Proben der verschiedenen Betriebe des Phagenmonitorings

Betrieb	Form	Starterkulturen		Molke	Salzbad	Frischkäse	Joghurt	Käse	Milch	Quark	Molkenpulver	Reinigungslösungen
		thermophil	mesophil									
Betrieb 1	Groß	3	1	1		1	1					
Betrieb 2	Groß	3		3				3				2
Betrieb 3	Groß	2	1	1	1		1				1	5
Betrieb 4	Groß		1	1								
Betrieb 5	KMU	1	2	1	1	1	1					
Betrieb 6	KMU		1			2						
Betrieb 7	KMU		3	1	1			1				2
Betrieb 8	KMU		1	2	1					1		
Betrieb 9	Groß		2	1		1	1					2
Betrieb 10	KMU	1	3	3			1					
Betrieb 11	Groß		2	8	1				1			3
Betrieb 12	KMU		1	1	1			1				
Betrieb 13	Groß	12					11					
Betrieb 14	Groß		1							1		
Betrieb 15	KMU	1	1	1	9				1			
Betrieb 16	Groß		1	1								
Betrieb 17	KMU	1	1				1			1		
Betrieb 26	Groß	1	2									3
Betrieb 30	Groß	5	1									3

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Inaktivierung von Phagen durch andere physikalische/chemische Methoden.....	9
Tabelle 1.2: Milchbestandteile mit Schutzwirkung auf die Hitzestabilität von Phagen.....	12
Tabelle 2.1: <i>L. lactis</i> Phagen mit zugehörigen Wirtstämmen	18
Tabelle 2.2: <i>S. thermophilus</i> Phagen mit zugehörigen Wirtstämmen	21
Tabelle 2.3: <i>Ln. mesenteroides</i> Phagen mit zugehörigen Wirtstämmen	22
Tabelle 2.4: <i>Lb. delbrueckii</i> Phagen mit zugehörigen Wirtstämmen	22
Tabelle 2.5: Primer zum Nachweis und Identifizierung der <i>L. lactis</i> Phagen (Labrie & Moineau, 2000).	28
Tabelle 2.6: Programm Multiplex-PCR <i>L. lactis</i> Phagen (Labrie & Moineau, 2000)	28
Tabelle 2.7: Primer zur Einteilung der <i>S. thermophilus</i> Phagen in <i>cos</i> - bzw. <i>pac</i> -Typ Phagen (Ali <i>et al.</i> , 2006)	29
Tabelle 2.8: Programm Multiplex-PCR <i>S. thermophilus</i> Phagen (Ali <i>et al.</i> , 2006).....	29
Tabelle 2.9: Übersicht der P001 Hitzestressphagen	33
Tabelle 3.1: Anzahl der phagenhaltigen Proben im Phagenmonitoring	36
Tabelle 3.2: Übersicht der Titer der <i>L. lactis</i> Phagen in den Proben der Großbetriebe, [PbE/ml].	37
Tabelle 3.3: Übersicht der Titer der <i>L. lactis</i> Phagen in den Proben der KMU, [PbE/ml].....	38
Tabelle 3.4: Spezieszuordnung der <i>L. lactis</i> Phagen in den Betrieben des Phagenmonitorings	46
Tabelle 3.5: Beschreibung der Orfs der Strukturproteine des <i>L. lactis</i> Phagen P008 (Mahony <i>et al.</i> , 2006)	49
Tabelle 3.6: NcoI/NsiI-Fragmente der <i>L. lactis</i> P008 Phagen DNA	50
Tabelle 3.7: Übersicht der <i>cos</i> - bzw. <i>pac</i> -Typ Zuordnung der <i>S. thermophilus</i> Phagen des Phagenmonitorings	56
Tabelle 3.8: Thermische Inaktivierung der <i>L. lactis</i> Phagen	60
Tabelle 3.9: Thermische Inaktivierung der <i>cos</i> - und <i>pac</i> -Typ <i>S. thermophilus</i> Phagen	69
Tabelle 3.10: Thermische Inaktivierung der <i>Ln. mesenteroides</i> Phagen.....	71
Tabelle 3.11: Thermische Inaktivierung der <i>Lb. delbrueckii</i> Phagen.	73
Tabelle 3.12: Erforderliche Temperatur zur vollständigen 5-minütigen Inaktivierung von „Salzbad“-Phagenisolaten	75
Tabelle 3.13: Thermische Inaktivierung der <i>L. lactis</i> Phagen während 10 Zyklen: Eintrocknung/erneute Resuspendierung in Magermilch.....	76
Tabelle 3.14: Deletionsbereich der DNA des Phagen BK5-T nach der 10. Trocknung	77
Tabelle 3.15: Reduktion des Phagentiters ($\log(N/N_0)$) bei der Erhitzung der <i>L. lactis</i> Phagen P008 und P680 in den verschiedenen Suspensionsmedien.....	82
Tabelle 4.1: Übersicht der thermoresistenten Phagen des Monitorings und deren Spezieszugehörigkeit (nach Müller-Merbach & Hinrichs, 2006).....	100
Tabelle 7.1: Anzahl der Proben der verschiedenen Betriebe des Phagenmonitorings	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Klassifizierung der <i>L. lactis</i> Phagen	4
Abbildung 1.2: Typische Morphologie der <i>S. thermophilus</i> Phagen (Bild H. Neve, MRI Kiel)	5
Abbildung 1.3: Typische Morphologie eines <i>Ln. mesenteroides</i> Phagen der Familie der <i>Siphoviridae</i> (Neve <i>et al.</i> , 1988).	6
Abbildung 3.1: Elektronenoptische Aufnahmen der Phagen der Großbetriebe	39
Abbildung 3.2: Elektronenoptische Aufnahmen der Phagen der KMU.	40
Abbildung 3.3: Elektronenoptische Aufnahmen der <i>L. lactis</i> Phagen (a) P1532, (b) P1569, (c) P4565.	41
Abbildung 3.4: Elektronenoptische Aufnahmen der <i>L. lactis</i> Phagen (a) CHPC21, (b) CHPC310, (c) CHPC412, (d) CHPC204, (e) CHPC364, (f) CHPC649.	42
Abbildung 3.5: Elektronenoptische Aufnahmen der <i>Ln. mesenteroides</i> Phagen (a) P728, (b) P1594, (c) P1599, (d) P958, (e) P4556.	43
Abbildung 3.6: Elektronenoptische Aufnahme des <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Phagen CHPC658.	44
Abbildung 3.7: Agarosegel (1,5 %) der PCR-Amplifikate von <i>L. lactis</i> Phagen.	45
Abbildung 3.8: DNA/DNA-Hybridisierung (Dot-Blot) von intakter DNA ausgewählter <i>L. lactis</i> Phagen.....	47
Abbildung 3.9: DNA/DNA-Hybridisierung (Dot-Blot) von intakter DNA ausgewählter <i>L. lactis</i> Phagen mit einer DNA-Sonde (Digoxigenin-markiert) des Referenzphagen r1t (P335-Spezies).	47
Abbildung 3.10: DNA/DNA-Hybridisierung (Southern-Blot) der Phagen.....	48
Abbildung 3.11: Elektronenoptische Darstellung der hitzeresistenten Referenzphagen P1532 (a) und P680 (b).	49
Abbildung 3.12: DNA/DNA-Hybridisierung (Southern-Blot) der Phagen P008 (Bahn 3) und P001 (4) mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde des hitzeresistenten Phagen P680 (2).	50
Abbildung 3.13: Agarosegel (1,5 %) zur Bestimmung der Genomorganisation durch Erhitzung der Restriktionsansätze.....	51
Abbildung 3.14: Agarosegel (1,5 %) der erhitzten und unerhitzten Restriktionsansätze ligierter DNA der <i>L. lactis</i> Phagen	52
Abbildung 3.15: PFGE ungeschnittener DNA	53
Abbildung 3.16: SDS-PAGE der Strukturproteine der hitzeresistenten <i>L. lactis</i> Phagen	54
Abbildung 3.17: Bestimmung der Detektionsgrenze des PCR-Nachweises zur Speziesbestimmung des <i>L. lactis</i> Phagen P1532.	55
Abbildung 3.18: DNA/DNA-Hybridisierung (Southern-Blot) der <i>Ln. mesenteroides</i> Phagen	57
Abbildung 3.19: Übersicht der Inaktivierungen der <i>L. lactis</i> Phagen	62
Abbildung 3.20: Thermische Inaktivierung der <i>L. lactis</i> 936 Phagenisolate aus einem Betrieb bei 80 °C (1 min) in Wasser.....	63
Abbildung 3.21: Thermische Inaktivierung der <i>L. lactis</i> Phagen TP901-1 und TP901-BC1034 bei 60 °C, Suspensionsmedium: Wasser. n = 2	64
Abbildung 3.22: Verteilung der P008-Phagentiter in ausgetropften CsCl-Dichtegradienten während einer 3-fach wiederholten CsCl-Dichtegradientenzentrifugation.	66
Abbildung 3.23: Thermische Inaktivierung des P008 Phagen unterschiedlicher Dichte bei 65 °C in Wasser.	67

Abbildung 3.24: Vergleich der P008-Phagen-DNA nach 1 bis 3 aufeinander folgenden CsCl-Dichtegradientenzentrifugationen der Phagen.	67
Abbildung 3.25: Übersicht der Inaktivierungen der <i>S. thermophilus</i> Phagen.....	70
Abbildung 3.26: Übersicht der Inaktivierungen der <i>Ln. mesenteroides</i> Phagen	72
Abbildung 3.27: Übersicht der Inaktivierungen der <i>Lb. delbrueckii</i> Phagen	73
Abbildung 3.28: Stabilität von <i>L. lactis</i> Phagen in den Salzbad-Rückstellproben A-J über einen 3-monatigen Zeitraum bei Raumtemperatur.	74
Abbildung 3.29: Restriktionsverdau der DNA des <i>L. lactis</i> BK5-T Phagen.....	77
Abbildung 3.30: Pulsfeld-Gelelektrophorese der ungeschnittenen DNAs der Phagen.....	78
Abbildung 3.31: Vergleich der Inaktivierung der Hitzestressderivate des <i>L. lactis</i> Phagen P001 mit dem Wildtypphagen P001 bei 65 °C in Wasser. n = 2.....	79
Abbildung 3.32: Restriktionsverdau der DNA des <i>L. lactis</i> Phagen P001 (Bahn 1), P001 ^k (Bahn 2) und P001 ^h (Bahn 3).....	80
Abbildung 3.33: Resttiter nach Inaktivierung der Einzelplaqueisolate der P001 Hitzestessderivate für 15 min bei 65 °C in Wasser.	81
Abbildung 3.34: Restriktionsverdau der DNA der Einzelplaqueisolate des <i>L. lactis</i> Phagen P001. ...	81
Abbildung 3.35: Elektronenoptische Aufnahmen des Phagen P008 vor und nach der Erhitzung (10 min, 70 °C) in unterschiedlichen Suspensionsmedien.	85
Abbildung 3.36: Elektronenoptische Aufnahmen des Phagen P008 vor und nach der Erhitzung (10 min, 70 °C) in unterschiedlichen Suspensionsmedien.	86
Abbildung 3.37: Elektronenoptische Aufnahmen des Phagen P008 vor und nach der Erhitzung (10 min, 70 °C) in unterschiedlichen Suspensionsmedien.	87
Abbildung 3.38: Elektronenoptische Aufnahmen des Phagen P680 vor und nach der Erhitzung (10 min, 85 °C) in unterschiedlichen Suspensionsmedien.	88
Abbildung 3.39: Elektronenoptische Aufnahmen des Phagen P680 vor und nach der Erhitzung (10 min, 85 °C) in unterschiedlichen Suspensionsmedien.	89
Abbildung 3.40: Elektronenoptische Aufnahmen des Phagen P680 vor und nach der Erhitzung (10 min, 85 °C) in unterschiedlichen Suspensionsmedien.	90
Abbildung 4.1: Übersicht der thermischen Inaktivierungen von Bakteriophagen.	99
Abbildung 4.2: Genomkarte des Phagen BK5-T	103
Abbildung 4.3: HpaII-Restriktionskarte des P001 Phagen-Genoms (Shearman <i>et al.</i> , 1991).	104

Lebenslauf

Name: Dietrich

Vorname: Jochen

Geburtsdatum: 31.05.1977

Geburtsort: Mainburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

2005 - Heute wiss. Mitarbeiter/Volontär am Max Rubner-Institut Kiel,
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie

1998 – 2004 Studium der Ökotoxikologie an der TU-
München/Weihenstephan

1987 – 1997 Gabelsberger Gymnasium Mainburg

8 Literaturverzeichnis

- Ackermann, H. W. & DuBow, M. S. 1987, Viruses of prokaryotes, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Adams, M. H. 1959, Bacteriophages, Interscience, New York.
- Adams, M. H. & Lark, G. 1950, Mutation to heat resistance in coliphage T5, *Journal of Immunology*, vol. 64, no. 4, pp. 335-347.
- Alatossava, T. 1982, Factors affecting *in vitro* DNA ejection of the *Lactobacillus lactis* bacteriophage LL-H, *Journal of General Virology*, vol. 59, pp. 173-175.
- Alatossava, T., Jutte, H. & Seiler, H. 1987, Transmembrane cation movements during infection of *Lactobacillus lactis* by bacteriophage LL-H, *Journal of General Virology*, vol. 68, pp. 1525-1532.
- Ali, Y., Neve, H. & Heller, K. J. 2006, Nachweis von Prophagen in lysogenen *Streptococcus thermophilus* Starterkulturen und deren Klassifizierung, BfEL Jahresbericht 2006, Institut für Mikrobiologie p. 125.
- Ammann, A., Neve, H., Geis, A. & Heller, K. J. 2008, Plasmid transfer via transduction from *Streptococcus thermophilus* to *Lactococcus lactis*, *Journal of Bacteriology*, vol. 190, no. 8, pp. 3083-3087.
- Bhattacharyya, S. C., Samad, S. A., Mandal, J. C. & Chatterjee, S. N. 1991, X-ray inactivation, weigle reactivation, and weigle mutagenesis of the lysogenic *Vibrio* Kappa phage, *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 37, no. 4, pp. 265-269.
- Bhimani, R. S. & Freitas, Y. M. 1993, Growth characteristics of lactococcal phages isolated from the dairy sources in India, *Journal of Dairy Science*, vol. 76, no. 11, pp. 3338-3349.
- Binetti, A. G. & Reinheimer, J. A. 2000, Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants, *Journal of Food Protection*, vol. 63, no. 4, pp. 509-515.
- Bingham, P. M., Baltz, R. H., Ripley, L. S. & Drake, J. W. 1976, Heat mutagenesis in bacteriophage T4: The transversion pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, no. 11, pp. 4159-4163.
- Boizet, B., Mata, M., Mignot, O., Ritzenthaler, P. & Sozzi, T. 1992, Taxonomic characterization of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc oenos* bacteriophage, *FEMS Microbiology Letters*, vol. 90, no. 3, pp. 211-216.
- Boyce, J. D., Davidson, B. E. & Hillier, A. J. 1995, Spontaneous deletion mutants of the *Lactococcus lactis* temperate bacteriophage BK5-T and localization of the BK5-T *attP* site, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, no. 11, pp. 4105-4109.
- Bradley, D. E. 1967, Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins, *Bacteriological Reviews*, vol. 31, no. 4, pp. 230-314.
- Bradley, D. W., Hess, R. A., Tao, F., Sciaba-Lentz, L., Remaley, A. T., Laugharn, J. A. & Manak, M. 2000, Pressure cycling technology: a novel approach to virus inactivation in plasma, *Transfusion*, vol. 40, no. 2, pp. 193-200.
- Braun, V., Hertwig, S., Neve, H., Geis, A. & Teuber, M. 1989, Taxonomic differentiation of bacteriophages of *Lactococcus lactis* by electron microscopy, DNA-DNA-hybridization, and protein profiles, *Journal of General Microbiology*, vol. 135, pp. 2551-2560.

- Brondsted, L., Ostergaard, S., Pedersen, M., Hammer, K. & Vogensen, F. K. 2001, Analysis of the complete DNA sequence of the temperate bacteriophage TP901-1: Evolution, structure, and genome organization of lactococcal bacteriophages, *Virology*, vol. 283, no. 1, pp. 93-109.
- Bruttin, A., Desiere, F., d'Amico, N., Guerin, J. P., Sidoti, J., Huni, B., Lucchini, S. & Brüssow, H. 1997, Molecular ecology of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage infections in a cheese factory, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, no. 8, pp. 3144-3150.
- Buzrul, S., Ozturk, P., Alpas, H. & Akcelik, M. 2007, Thermal and chemical inactivation of lactococcal bacteriophages, *LWT - Food Science and Technology*, vol. 40, no. 10, pp. 1671-1677.
- Capra, M. L., Quiberoni, A. & Reinheimer, J. A. 2004, Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophages, *Letters in Applied Microbiology*, vol. 38, no. 6, pp. 499-504.
- Casey, C. N., Morgan, E., Daly, C. & Fitzgerald, G. F. 1993, Characterization and classification of virulent lactococcal bacteriophages isolated from a cheddar cheese plant, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 74, no. 3, pp. 268-275.
- Chandry, P. S., Moore, S. C., Boyce, J. D., Davidson, B. E. & Hillier, A. J. 1997, Analysis of the DNA sequence, gene expression, origin of replication and modular structure of the *Lactococcus lactis* lytic bacteriophage sk1, *Molecular Microbiology*, vol. 26, no. 1, pp. 49-64.
- Chen, H. Q., Joerger, R. D., Kingsley, D. H. & Hoover, D. G. 2004, Pressure inactivation kinetics of phage lambda cl 857, *Journal of Food Protection*, vol. 67, no. 3, pp. 505-511.
- Chopin, M. C. 1980, Resistance of 17 mesophilic lactic *Streptococcus* bacteriophages to pasteurization and spray-drying, *Journal of Dairy Research*, vol. 47, no. 1, pp. 131-139.
- Chopin, M. C., Chopin, A. & Roux, C. 1976, Definition of bacteriophage groups according to their lytic action on mesophilic lactic streptococci, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 32, no. 6, pp. 741-746.
- Christiansen, B., Johnsen, M. G., Stenby, E., Vogensen, F. K. & Hammer, K. 1994, Characterization of the lactococcal temperate phage TP901-1 and its site-specific integration, *Journal of Bacteriology*, vol. 176, no. 4, pp. 1069-1076.
- Cogan, T. M. & Jordan, K. N. 1994, Metabolism of *Leuconostoc* bacteria, *Journal of Dairy Science*, vol. 77, no. 9, pp. 2704-2717.
- Coveney, J. A., Fitzgerald, G. F. & Daly, C. 1987, Detailed characterization and comparison of four lactic streptococcal bacteriophages based on morphology, restriction mapping, DNA homology, and structural protein analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 53, no. 7, pp. 1439-1447.
- d'Herelle, F. 1917, Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques., *Comptes Rendus à l'Academie des Sciences*, vol. 165, pp. 373-375.
- Daoust, R. D., El-Bisi, M. H. & Litsky, W. 1965, Thermal destruction kinetics of a lactic streptococcal bacteriophage, *Applied Microbiology*, vol. 13, no. 3, pp. 478-485.
- Davey, G. P., Ward, L. J. H. & Brown, J. C. S. 1995, Characterization of four *Leuconostoc* bacteriophages isolated from dairy fermentations, *FEMS Microbiology Letters*, vol. 128, no. 1, pp. 21-25.
- Deveau, H., Labrie, S. J., Chopin, M. C. & Moineau, S. 2006, Biodiversity and classification of lactococcal phages, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 6, pp. 4338-4346.
- DIN EN 13610 2003, Chemische Desinfektionsmittel - Quantitativer Suspensionsversuchs zur Bestimmung der viruziden Wirkung gegenüber Bakteriophagen von chemischen

Desinfektionsmitteln in den Bereichen Lebensmittel und Industrie - Prüfverfahren und Anforderungen

- Drake, J. W. 1966, Spontaneous mutations accumulating in bacteriophage T4 in complete absence of DNA replication, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 55, no. 4, pp. 738-743.
- Durmaz, E. & Klaenhammer, T. R. 2000, Genetic analysis of chromosomal regions of *Lactococcus lactis* acquired by recombinant lytic phages, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 3, pp. 895-903.
- Elliker, P. R., Anderson, A. W. & Hannesson, G. 1956, An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli, *Journal of Dairy Science*, vol. 39, no. 11, pp. 1611-1612.
- Europäische Gemeinschaften 2006, Die neue KMU-Definition Benutzerhandbuch und Mustererklärung, Amt für Veröffentlichungen, ISBN 92-894-7907-8.
- Fabrizio, S. V. d., Ledford, R. A. & Parada, J. L. 1999, Heat resistance of *Lactococcus lactis* bacteriophages, *Microbiology-Aliments-Nutrition*, vol. 17, pp. 191-198.
- Geller, B. L., Ivey, R. G., Trempey, J. E. & Hettingersmith, B. 1993, Cloning of a chromosomal gene required for phage infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* c2, *Journal of Bacteriology*, vol. 175, no. 17, pp. 5510-5519.
- Geller, B. L., Ngo, H. T., Mooney, D. T., Su, P. & Dunn, N. 2005, Lactococcal 936-species phage attachment to surface of *Lactococcus lactis*, *Journal of Dairy Science*, vol. 88, no. 3, pp. 900-907.
- Hammer, B. W. & Babel, F. J. 1943, Bacteriology of butter cultures: a review, *Journal of Dairy Science*, vol. 26, no. 2, pp. 83-168.
- Hartman, P. S., Eisenstark, A. & Pauw, P. G. 1979, Inactivation of phage T7 by near-ultraviolet radiation plus hydrogen peroxide: DNA-Protein crosslinks prevent DNA injection, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 76, no. 7, pp. 3228-3232.
- Hershey, A. D., Goldberg, E., Burgi, E. & Ingraham, L. 1963, Local denaturation of DNA by shearing forces and by heat, *Journal of Molecular Biology*, vol. 6, no. 3, pp. 230-243.
- Hertel, R., Marchi, L. & Muller, K. 1962, Density mutants of phage T5, *Virology*, vol. 18, no. 4, pp. 576-581.
- Hiatt, C. W. 1964, Kinetics of inactivation of viruses, *Bacteriological Reviews*, vol. 28, no. 2, pp. 150-163.
- Huggins, A. R. & Sandine, W. E. 1977, Incidence and properties of temperate bacteriophages induced from lactic streptococci, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 33, no. 1, pp. 184-191.
- Hunter, G. J. E. 1944, The influence of bacteriophage on the cheese-making process, *Journal of Dairy Research*, vol. 13, pp. 294-301.
- Ifft, J. B., Martin, W. R. & Kinzie, K. 1970, Density gradient proportionality constants for a number of aqueous binary solutions, *Biopolymers*, vol. 9, no. 5, pp. 597-614.
- Jarvis, A. W. 1984, Differentiation of lactic streptococcal phages into phage species by DNA-DNA homology, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 47, no. 2, pp. 343-349.
- Jarvis, A. W., Fitzgerald, G. F., Mata, M., Mercenier, A., Neve, H., Powell, I. B., Ronda, C., Saxelin, M. & Teuber, M. 1991, Species and type phages of lactococcal bacteriophages, *Intervirology*, vol. 32, no. 1, pp. 2-9.

- Josephsen, J., Andersen, N., Behrndt, H., Brandsborg, E., Christiansen, G., Hansen, M. B., Hansen, S., Nielsen, E. W. & Vogensen, F. K. 1994, An ecological study of lytic bacteriophages of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated in a cheese plant over a five year period, *International Dairy Journal*, vol. 4, pp. 123-141.
- Josephsen, J. & Neve, H. 2004, Bacteriophage and antiphage mechanisms of lactic acid bacteria. In: *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects*, S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehandt, eds., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 295-350.
- Kakita, Y., Kashige, N., Murata, K., Kuroiwa, A., Funatsu, M. & Watanabe, K. 1995, Inactivation of *Lactobacillus* bacteriophage-PL-1 by microwave irradiation, *Microbiology and Immunology*, vol. 39, no. 8, pp. 571-576.
- Kashige, N., Kakita, Y., Nakashima, Y., Miake, F. & Watanabe, K. 2001, Mechanism of the photocatalytic inactivation of *Lactobacillus casei* phage PL-1 by titania thin film, *Current Microbiology*, vol. 42, no. 3, pp. 184-189.
- Kasturi, C. & Platz, M. S. 1992, Inactivation of lambda phage with 658 nm light using a DNA-binding porphyrin sensitizer, *Photochemistry and Photobiology*, vol. 56, no. 4, pp. 427-429.
- Kenny, J. G., McGrath, S., Fitzgerald, G. F. & van Sinderen, D. 2004, Bacteriophage Tuc2009 encodes a tail-associated cell wall-degrading activity, *Journal of Bacteriology*, vol. 186, no. 11, pp. 3480-3491.
- Kindt, J., Tzlil, S., Ben-Shaul, A. & Gelbart, W. M. 2001, DNA packaging and ejection forces in bacteriophage, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 24, pp. 13671-13674.
- Kivi, S., Peltomaki, T., Luomala, K. & Sarimo, S. S. 1987, Some properties of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages, *Folia Microbiologica*, vol. 32, no. 2, pp. 101-106.
- Koch, B., Christiansen, B., Evison, T., Vogensen, F. K. & Hammer, K. 1997, Construction of specific erythromycin resistance mutations in the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1 and their use in studies of phage biology, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, no. 6, pp. 2439-2441.
- Koizumi, Y. & Taya, M. 2002, Kinetic evaluation of biocidal activity of titanium dioxide against phage MS2 considering interaction between the phage and photocatalyst particles, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 12, no. 2, pp. 107-116.
- Koka, M. & Mikolajc, E. M. 1967, Kinetics of thermal destruction of bacteriophages active against *Streptococcus cremoris*, *Journal of Dairy Science*, vol. 50, no. 7, pp. 1025-1031.
- Koka, M. & Mikolajc, E. M. 1970, Kinetics of thermal destruction of bacteriophages active against *Streptococcus lactis*, *Journal of Dairy Science*, vol. 53, no. 7, pp. 853-856.
- Kraus, J. & Geller, B. L. 1998, Membrane receptor for prolate phages is not required for infection of *Lactococcus lactis* by small or large isometric phages, *Journal of Dairy Science*, vol. 81, no. 9, pp. 2329-2335.
- Krusch, U. 1979, Vorkommen und Nachweis von Bakteriophagen im Betrieb, *Deutsche Milchwirtschaft*, vol. 30, pp. 1089-1097.
- Krusch, U., Neve, H., Luschei, B. & Teuber, M. 1987, Characterization of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by host specificity and electron microscopy, *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, vol. 39, no. 3, pp. 155-167.
- Laborius, A. 2004, Verbreitung, Wirtsspezifität und Populationsfluktuationen von *Lactococcus lactis* Bakteriophagen bei der Quarkherstellung, Dissertation, Univ. Dresden.

- Labrie, S. & Moineau, S. 2000, Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 3, pp. 987-994.
- Lee, S., Nakamura, M. & Ohgaki, S. 1998, Inactivation of phage Q beta by 254nm UV light and titanium dioxide photocatalyst, *Journal of Environmental Science and Health Part A Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, vol. 33, no. 8, pp. 1643-1655.
- LeMarrec, C., vanSinderen, D., Walsh, L., Stanley, E., Vlegels, E., Moineau, S., Heinze, P., Fitzgerald, G. & Fayard, B. 1997, Two groups of bacteriophages infecting *Streptococcus thermophilus* can be distinguished on the basis of mode of packaging and genetic determinants for major structural proteins, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, no. 8, pp. 3246-3253.
- Lillehaug, D. 1997, An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 83, no. 1, pp. 85-90.
- Löff, D., Schillen, K., Jonsson, B. & Evilevitch, A. 2007, Forces controlling the rate of DNA ejection from phage lambda, *Journal of Molecular Biology*, vol. 368, no. 1, pp. 55-65.
- Loof, M., Lembke, J. & Teuber, M. 1983, Characterization of the genome of the *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* bacteriophage P008 wide-spread in German cheese factories, *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 4, no. 3, pp. 413-423.
- Madera, C., Monjardín, C. & Suarez, J. 2004, Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 12, pp. 7365-7371.
- Mahanivong, C., Boyce, J. D., Davidson, B. E. & Hillier, A. J. 2001, Sequence analysis and molecular characterization of the *Lactococcus lactis* temperate bacteriophage BK5-T, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no. 8, pp. 3564-3576.
- Mahony, J., Deveau, H., Mc Grath, S., Ventura, M., Canchaya, C., Moineau, S., Fitzgerald, G. F. & van Sinderen, D. 2006, Sequence and comparative genomic analysis of lactococcal bacteriophages jj50, 712 and P008: evolutionary insights into the 936 phage species, *FEMS Microbiology Letters*, vol. 261, no. 2, pp. 253-261.
- Mata, M., Trautwetter, A., Luthaud, G. & Ritzenthaler, P. 1986, 13 virulent and temperate bacteriophages of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis* belong to a single DNA homology group, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 52, no. 4, pp. 812-818.
- Maze, P. 1946, *La genese et la persistance des elements degeneres dans les souches stables des ferments lactiques normaux du lait, *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales*, vol. 140, no. 5, pp. 355-356.
- McGrath, S., Fitzgerald, G. F. & van Sinderen, D. 2004, Starter Cultures: Bacteriophage. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1 P. F. Fox, T. M. Cogan, & T. P. Guinee, eds., Elsevier Academic Press, pp. 163-189.
- Mikkonen, M., Raisanen, L. & Alatossava, T. 1996, The early gene region completes the nucleotide sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* phage LL-H, *Gene*, vol. 175, no. 1-2, pp. 49-57.
- Milch-Industrie-Verband: 2008, www.milchindustrie.de.
- Moineau, S., Borkeav, M., Holler, B. J., Walker, S. A., Kondo, J. K., Vedamuthu, E. R. & Vandenberg, P. A. 1996, Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States, *Journal of Dairy Science*, vol. 79, no. 12, pp. 2104-2111.
- Monteville, M. R., Ardestani, B. & Geller, B. L. 1994, Lactococcal bacteriophages require a host cell wall carbohydrate and a plasma membrane protein for adsorption and ejection of DNA, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 9, pp. 3204-3211.

- Moroni, O., Jean, J., Autret, J. & Fliss, I. 2002, Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure, *International Dairy Journal*, vol. 12, no. 11, pp. 907-913.
- Müller-Merbach, M. & Hinrichs, J. 2006, Thermal and hydrostatic inactivation of bacteriophages, *Chemie Ingenieur Technik*, vol. 78, no. 11, pp. 1723-1730.
- Müller-Merbach, M., Neve, H. & Hinrichs, J. 2005a, Kinetics of the thermal inactivation of the *Lactococcus lactis* bacteriophage P008, *Journal of Dairy Research*, vol. 72, pp. 281-286.
- Müller-Merbach, M., Rauscher, T. & Hinrichs, J. 2005b, Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment, *International Dairy Journal*, vol. 15, no. 6-9, pp. 777-784.
- Neve, H., Berger, A. & Heller, K. J. 1995, A method for detecting and enumerating airborne virulent bacteriophage of dairy starter cultures, *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, vol. 47, no. 3, pp. 193-207.
- Neve, H., Dietrich, J. & Heller, K. J. 2005, A note on long-term stability of *Lactococcus lactis* phages in cheese brine, *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, vol. 57, pp. 191-200.
- Neve, H., Kemper, U., Geis, A. & Heller, K. J. 1994, Monitoring and characterization of lactococcal bacteriophages in a dairy plant, *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, vol. 46, no. 2, pp. 167-178.
- Neve, H., Krusch, U. & Teuber, M. 1989, Classification of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* isolated from yogurt and swiss-type cheese, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 30, no. 6, pp. 624-629.
- Neve, H., Lilischkis, R. & Teuber, M. 1988, Characterization of a virulent bacteriophage of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, vol. 40, no. 3, pp. 205-212.
- Neve, H., vonMaurich, A. & Heller, K. J. 1996, Testing of the virucidal activity of disinfectants with bacteriophages of lactic acid bacteria, *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, vol. 48, no. 4, pp. 359-370.
- Neve, H., Zenz, K. I., Desiere, F., Koch, A., Heller, K. J. & Brussow, H. 1998, Comparison of the lysogeny modules from the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophages TP-J34 and Sfi21: Implications for the modular theory of phage evolution, *Virology*, vol. 241, no. 1, pp. 61-72.
- Pedersen, M., Ostergaard, S., Bresciani, J. & Vogensen, F. K. 2000, Mutational analysis of two structural genes of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1 involved in tail length determination and baseplate assembly, *Virology*, vol. 276, no. 2, pp. 315-328.
- Peterson, S. D. & Marshall, R. T. 1990, Nonstarter lactobacilli in cheddar cheese - a review, *Journal of Dairy Science*, vol. 73, no. 6, pp. 1395-1410.
- Pollard, E. C. & Solosko, W. 1971, Thermal inactivation of T4 and Lambda bacteriophage, *Biophysical Journal*, vol. 11, no. 1, pp. 66-74.
- Proux, C., van Sinderen, D., Suarez, J., Garcia, P., Ladero, V., Fitzgerald, G. F., Desiere, F. & Brussow, H. 2002, The dilemma of phage taxonomy illustrated by comparative genomics of Sfi21-like *Siphoviridae* in lactic acid bacteria, *Journal of Bacteriology*, vol. 184, no. 21, pp. 6026-6036.
- Quiberoni, A., Guglielmotti, D. M. & Reinheimer, J. A. 2003a, Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 84, no. 1, pp. 51-62.

- Quiberoni, A., Stiefel, J. I. & Reinheimer, J. A. 2000, Characterization of phage receptors in *Streptococcus thermophilus* using purified cell walls obtained by a simple protocol, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 89, no. 6, pp. 1059-1065.
- Quiberoni, A., Suarez, V. B. & Reinheimer, J. A. 1999b, Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments, *Journal of Food Protection*, vol. 62, no. 8, pp. 894-898.
- Quiberoni, A., Tremblay, D., Ackermann, H. W., Moineau, S. & Reinheimer, J. A. 2006c, Diversity of *Streptococcus thermophilus* phages in a large-production cheese factory in Argentina, *Journal of Dairy Science*, vol. 89, no. 10, pp. 3791-3799.
- Ritchie, D. A. & Malcolm, F. E. 1970, Heat-stable and density mutants of phages T1, T3 and T7, *Journal of General Virology*, vol. 9, pp. 35-43.
- Rubenstein, I. 1968, Heat-stable mutants of T5 phage 1. physical properties of phage and their DNA molecules, *Virology*, vol. 36, no. 3, pp. 356-376.
- Saigo, K. 1978, Isolation of high-density mutants and identification of nonessential structural proteins in bacteriophage T5 - Dispensability of L-shaped tail fibers and a secondary major head protein, *Virology*, vol. 85, no. 2, pp. 422-433.
- Salminen, S., von Wright, A. & Ouwehandt, A. 2004, *Lactic acid bacteria*, 3. ed, Marcel Dekker Inc., New York.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sechaud, L., Cluzel, P. J., Rousseau, M., Baumgartner, A. & Accolas, J. P. 1988, Bacteriophages of lactobacilli, *Biochimie*, vol. 70, no. 3, pp. 401-410.
- Shearman, C. A., Hertwig, S., Teuber, M. & Gasson, M. J. 1991, Characterization of the prolate-headed lactococcal bacteriophage vML3 - Location of the lysin gene and its DNA homology with other prolate-headed phages, *Journal of General Microbiology*, vol. 137, pp. 1285-1291.
- Shin, C. & Sato, Y. 1979, Isolation of *Leuconostoc* bacteriophages from dairy products, *Japanese Journal of Zootechnical Science*, vol. 50, no. 6, pp. 419-422.
- Shin, C. & Sato, Y. 1980, Lysogeny in *Leuconostocs*, *Japanese Journal of Zootechnical Science*, vol. 51, pp. 478-484.
- Shin, C. & Sato, Y. 1981, Some characteristics of *Leuconostoc dextranicum* phage Ld-6, *Japanese Journal of Zootechnical Science*, vol. 52, no. 9, pp. 639-645.
- Smiddy, M., Kelly, A. L., Patterson, M. F. & Hill, C. 2006, High pressure-induced inactivation of Q beta coliphage and c2 phage in oysters and in culture media, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 106, no. 2, pp. 105-110.
- Sozzi, T., Poulin, J., Maret, R. & Pousaz, R. 1978, Isolation of a bacteriophage of *Leuconostoc mesenteroides* from dairy products, *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 44, no. 1, pp. 159-161.
- Suarez, V. B., Quiberoni, A., Binetti, A. G. & Reinheimer, J. A. 2002, Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries, *Journal of Food Protection*, vol. 65, no. 10, pp. 1597-1604.
- Suarez, V. B. & Reinheimer, J. A. 2002, Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian *Lactococcus lactis* phages, *Journal of Food Protection*, vol. 65, no. 11, pp. 1756-1759.

- Svensson, U. & Christiansson, A. 1991, Methods for phage monitoring, IDF-Bulletin, vol. 263, pp. 29-39.
- Terzaghi, B. E. & Sandine, W. E. 1975, Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages, Applied Microbiology, vol. 29, no. 6, pp. 807-813.
- Twort, F. W. 1915, An investigation on the nature of the ultramicroscopic viruses., Lancet pp. 1241-1243.
- Valyasevi, R., Sandine, W. E. & Geller, B. L. 1990, The bacteriophage kh receptor of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Kh is the rhamnose of the extracellular wall polysaccharide, Applied and Environmental Microbiology, vol. 56, no. 6, pp. 1882-1889.
- van Sinderen, D., Karsens, H., Kok, J., Terpstra, P., Ruiters, M. H. J., Venema, G. & Nauta, A. 1996, Sequence analysis and molecular characterization of the temperate lactococcal bacteriophage r1t, Molecular Microbiology, vol. 19, no. 6, pp. 1343-1355.
- Vegge, C. S., Brondsted, L., Neve, H., Mc Grath, S., van Sinderen, D. & Vogensen, F. K. 2005, Structural characterization and assembly of the distal tail structure of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1, Journal of Bacteriology, vol. 187, no. 12, pp. 4187-4197.
- Watanabe, K., Sasaki, T., Kashige, N., Ishibashi, K., Nakashima, Y. & Hayashida, M. 1985, Mechanism of *in vitro* inactivation of *Lactobacillus* phage PL-1 by D-glucosamine, Agricultural and Biological Chemistry, vol. 49, no. 1, pp. 63-70.
- Watanabe, K. & Takesue, S. 1973, Energy requirement for formation of blender-resistant complexes in *Lactobacillus* phage infection, Journal of General Virology, vol. 20, pp. 319-326.
- Watanabe, K. & Takesue, S. 1975, Use of L-rhamnose to study irreversible adsorption of bacteriophage PL-1 to a strain of *Lactobacillus casei*, Journal of General Virology, vol. 28, pp. 29-35.
- Whitehead, H. R. & Hunter, G. J. E. 1945, Bacteriophage infection in cheese manufacture, Journal of Dairy Research, vol. 14, no. 1-2, pp. 64-80.
- Wilkowske, H. H., Nelson, F. E. & Parmelee, C. E. 1954, Heat inactivation of bacteriophage strains active against lactic streptococci, Applied Microbiology, vol. 2, no. 5, pp. 250-253.
- Wommack, K. E. & Colwell, R. R. 2000, Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems, Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 64, no. 1, pp. 69-114.
- Zamenhof, S. & Greer, S. 1958, Heat as an agent producing high frequency of mutations and unstable genes in *Escherichia coli*, Nature, vol. 182, no. 4635, pp. 611-613.
- Zottola, E. A. & Marth, E. H. 1966, Thermal inactivation of bacteriophages active against lactic streptococci, Journal of Dairy Science, vol. 49, no. 11, pp. 1338-1342.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. J. Heller für die Vergabe des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die anregenden Diskussionen. Herrn Dr. H. Neve danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, die anregenden Diskussionen, der Einweisung in die Elektronenmikroskopie und der Hilfe bei der Erstellung der vielen Berichte und auch dieser Arbeit. Den Herren Dr. A. Geis und Dr. W. Bockelmann möchte ich für ihre fachliche Unterstützung danken.

Besonderer Dank gilt den Projektpartnern Herrn Prof. Dr. J. Hinrichs, Frau Dr. M. Müller-Merbach und Frau Z. Dogan für die schöne und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Ein ganz spezieller Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie, die mich während meiner Arbeit tatkräftig unterstützt haben, insbesondere Inka Lammertz, Angela Back, Anika Petrowski, Niels Rösch, Gisela Paasch, Veronika Wind und Vera Meiners. Die Zeit wäre nur halb so schön gewesen ohne die großartige Unterstützung und Motivation durch viele Doktoranden, Diplomanden, Masteretten, Bacheloretten, Auszubildenden, Schülern, Praktikanten und Volontären, nämlich: Andreas Ammann, Stephan Scholtz, Yahya Ali, Mazhar Mohamed, Elsayed Ismail, André Göhler, Sebastian Ryk, Susan Lassen, Natascha Lüth, Oliver Tobies, Anja Trolle, Maike Föste, Anne Hammer, Alexander Schneider, den Zwillingen, Mona Melchin, und und und.... Bei Britta Kaminski und Annegret Laudy möchte ich mich für die hervorragende administrative Betreuung bedanken und für die angenehmen Frühstückspausen. Vielen Dank auch für die unzähligen Süßigkeiten, Kuchen und sonstigen Lebensmittel.

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMW) via AiF über den Forschungsbereich der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert (AiF-Projekt 14339 N).