

**Hochschule Neubrandenburg**  
**Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften**  
Studiengang Lebensmitteltechnologie  
WS 2010/2011

Entwicklung eines Plaquetests zur Bestimmung von  
Phagentitern bei der industriellen Schnittkäseherstellung

Bachelorarbeit

urn:nbn:de:gbv:519-thesis2011-0066-4

Verfasser: Stefanie Fethke

Betreuer: Prof. Dr. Karl Steffens  
Prof. Dr. Siegfried Bolenz

Neubrandenburg, 29.03.11

## Abstract

The subject of this paper is the detection of *Lactococcus* phages in the dairy factory Zentralkäse-rei Mecklenburg-Vorpommern GmbH. Therefore a plaque count method should be developed. First, growth of lactic acid bacteria on the media used for the experiments must be confirmed. Then it should be tested, whether a reproducible test is available and whether starter cultures, used in the dairy factory, contain bacteriophages. So, a series of experiments, using a variety of parameters, was conducted.

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung 3
2	Stand der Wissenschaft und Technik 4
3	Material 6
4	Versuchsdurchführung 7
4.1	Durchführung des Vorversuches 7
4.2	Durchführung der Hauptversuche 9
5	Ergebnisse 11
5.1	Ergebnisse des Vorversuches 11
5.2	Ergebnisse der Hauptversuche 12
6	Diskussion 15
7	Zusammenfassung 17
8	Literaturverzeichnis 18
9	Abbildungsverzeichnis 19
	Anhang I 20
	Anhang II 21

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung
pfu	plaque forming unit
MRS	deMan, Rogosa, Sharp
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

## 1 Einleitung

Das Thema dieser Arbeit lautet „Entwicklung eines Plaquetests zur Bestimmung von Phagentitern bei der industriellen Schnittkäseherstellung“.

Bakteriophagen sind Viren, die Bakterien befallen um sich zu vermehren. Sie setzen sich spezifisch auf die Oberfläche ihrer Wirtszelle und schleusen ihre RNA oder DNA ein. Nach der Bildung von neuen Phagen in der Zelle wird eine Art Lysozym gebildet. Der osmotische Innendruck der Wirtszelle kann nicht aufrechterhalten werden. Die Zelle stirbt und die neu gebildeten Phagen werden freigesetzt.

Zur Bestimmung von Phagentitern gibt es mehrere Möglichkeiten. Zum Einen kann man Bakteriophagen unter einem Elektronenmikroskop sichtbar machen. Zum Anderen nutzt man Plaquetests, da nicht jedem Labor ein Elektronenmikroskop zur Verfügung steht. Bei einem Plaquetest werden Phagen und deren spezifische Wirtszellen auf einen Nährboden aufgebracht. Nach der Inkubation erkennt man, dass sich Kolonien gebildet haben in denen sich Löcher, sogenannte Plaques, befinden. Diese Plaques zeigen an, dass die Bakteriophagen in die Zielzellen eingedrungen sind und sie lysiert haben. Nach Auszählung und Hinzuziehung der Verdünnungsfaktoren lässt sich der Phagentiter bestimmen.

Besonders die Molkereiindustrie muss auf Phagenbefall achten. Häufig kommt es zur Ansammlung und Vermehrung von Bakteriophagen im Bereich der Starterkulturenzüchtung und Molkeabtrennung bei der Käseherstellung durch Aerosolbildung. Desweiteren sind oftmals auch Bakteriophagen in der Luft in Molkereibetrieben zu finden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es also, einen Plaquetest für den Schnittkäsehersteller Zentralkäserei Mecklenburg-Vorpommern GmbH zu entwickeln, der bei Verdacht auf Bakteriophagen im Labor angewendet werden kann.

## 2 Stand der Wissenschaft und Technik

In der Molkereiindustrie spielen Mikroorganismen eine entscheidende Rolle. Um die Vielzahl an Milchprodukten herzustellen bedarf es verschiedene Milchsäurebakterien. Milchsäurebakterien sind gram-positiv, katalase-negativ und meist aerotolerant. Jährlich werden weltweit ca.  $10^{23}$  Milchsäurebakterien für Fermentationszwecke genutzt (Moineau *et al.*, 2002).

Dabei besteht die Gefahr, dass diese Zellen von Bakteriophagen angegriffen werden, denn sie sind ubiquitär verbreitet. Rund 80 % aller Fermentationsstörungen sind auf Phagen zurückzuführen. Laut Moineau *et al.* (2002) besteht das Ziel nicht in der Beseitigung der Phagen, sondern in der Kontrolle, da eine vollständige Beseitigung nicht möglich ist.

Bakteriophagen sind Viren, deren Wirte Bakterien sind. Laut Kutter *et al.* (2005) besitzen sie entweder DNA oder RNA, eingeschlossen in einem Protein- oder Lipoproteinmantel oder Capsid. Zusammen bilden sie das Nucleocapsid. Sie können selbst keine Energie erzeugen und besitzen keine Ribosomen um Proteine herzustellen. Bakteriophagen haben ein sehr spezifisches Wirtsspektrum. Dieses hat sich entwickelt, da sich die Bakteriophagen kontinuierlich während der Evolution an die Bakterien anpassen konnten. Bei Abwesenheit der entsprechenden Wirte können Phagen viele Jahre überleben, vorausgesetzt sie werden nicht beschädigt.

Man teilt Bakteriophagen in virulente und temperente Phagen ein. Temperente Phagen schleusen ihre DNA oder RNA in die der Wirtszelle ein und bilden Prophagen. Das hat den Vorteil, dass die Wirtszelle nicht zerstört wird. Virulente Phagen nutzen den lytischen Zyklus. Das bedeutet, dass in der Wirtszelle neue Phagen entstehen und durch Zellyse freigesetzt werden. Phagen der Milchsäurebakterien nutzen den lytischen Zyklus.

Da Phagen keine Energie erzeugen, bewegen sie sich passiv. Sie werden z.B. durch Aerosole transportiert. Heller *et al.* (2011) schreiben: „Die Erkennung einer Wirtszelle wird durch spezifische rezeptorvermittelte Adsorption des Phagen an die Zelloberfläche gewährleistet. Die Erkennung des Rezeptors erfolgt in allen Fällen über spezifische Rezeptorbindeproteine des Phagen“. Als Phagenrezeptor bei Milchsäurebakterien dient das Peptidoglykan oder Teichonsäuren. Bakteriophagen lagern mithilfe von nach außen gerichteten Schwanzfaserproteinen an die Wirtszellen an. Möglich ist aber auch Adsorption über Proteine der Basisplatte oder über keilförmige Strukturen. Diese Bindeproteine werden auch Adhesine genannt (Heller *et al.*, 2011). Am Ende der Morphogenese können, je nach Art, bis zu 100 neue Phagen in die Umwelt entlassen werden, die sich, dank des flüssigen Mediums der Milch, leicht verteilen (Moineau *et al.*, 2002).

Phagen sind überall zu anzutreffen. Man findet schon in der Rohmilch bis zu  $10^1 - 10^4$  pfu (plaque forming units) pro ml, da beim Melken keine sterilen Bedingungen herrschen. Auch in

der Fabrikluft sind Bakteriophagen zu finden. Diesbezüglich wurden in einem Betrieb  $10^5$  pfu/m<sup>3</sup> Luft entdeckt. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass Phagen mit den Starterkulturen in den Betrieb gebracht werden. In der bei der Käseherstellung anfallenden Molke wurden bis zu  $10^9$  pfu/ml gefunden. Dies ist ein kritischer Punkt, da in der Zentralkäserei Mecklenburg-Vorpommern GmbH das Molke-Bruch-Gemisch mit vorhandener Molke gespült wird. Somit könnte Phagenvermehrung gefördert werden. Salzbäder können eine Phagenkonzentration von  $3 \cdot 10^8$  pfu/ml erreichen. Ab einem Wert von  $10^5 - 10^6$  pfu/ml ist die Fermentation erheblich gestört. Eine Pasteurisation vor der Verwendung der Milch bringt wenig Erfolg, da Bakteriophagen eine Pasteurisation überleben können (Kutter *et al.*, 2005). Heller *et al.* (2011) meinen dazu: „Einige hoch hitzeresistente Bakteriophagen lassen sich nicht einmal durch deutlich erhöhte Temperaturen nennenswert inaktivieren“.

Um Phagenstämme und Phagentiter zu detektieren gibt es verschiedene Möglichkeiten. Mit einem Elektronenmikroskop kann man ermitteln, um welchen Phagen es sich genau handelt und auch der Titer kann damit bestimmt werden. Allerdings verfügt nicht jedes Labor über diese Technik, die auch kostenintensiv ist (Marks *et al.*, 2000). Mithilfe des Plaquetests kann man den Phagentiter bestimmen. Laut Süßmuth *et al.* (1999) kann man zwei Methoden anwenden. Zum Einen das Oberflächenverfahren, bei dem ein Grundagar gegossen und getrocknet wird. Dann wird eine Bakteriensuspension der entsprechenden Wirtszelle aufgetragen. Danach plattiert man die Phagensuspension. Zum Anderen gibt es das Schichtverfahren. Dabei gibt man die Phagen und die Wirtszellen zusammen, bevor plattiert wird. Tanaka *et al.* (1994) haben Versuche mit Silage durchgeführt, in dem sie ein Gramm Probe in 10 ml MRS-Bouillon gegeben und Übernacht inkubiert haben. Dann wird die Bouillon gefiltert und zentrifugiert. Der Überstand wird ultrafiltriert und als Probe für die Entdeckung der Phagen genutzt. Die Proben werden auf MRS-Agarplatten gegeben und inkubiert.

### 3 Material

#### Bakterienstämme

*Lactococcus lactis subsp. lactis* und der offizielle Phage für *Lactococcus lactis* P008 wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig (<http://www.dsmz.de>) bezogen. Sie werden vorschriftsmäßig bei + 8 °C gelagert. Daten zu *Lactococcus lactis subsp. lactis* und Phagen P008 sind in Anhang II zu finden. Die Starterkulturen wurden von der Firma CSK Food Enrichment, Leuwarden, Niederlande (<http://www.cskfood.com>) bezogen. Es handelt sich um C25, Batchnummer 1.23546, und C61, Batchnummer 1.23364. Das sind mesophile Kulturen, die nur *L. lactis ssp. lactis* enthalten. Laut Hersteller sollten die Kulturen bei – 35 °C gelagert werden, allerdings konnten sie vor den Versuchen, wegen nicht ausreichender Kühlleistung, nur bei – 15 °C in Cryo-Röhrchen gelagert werden.

Chemikalien wurden von folgenden Anbietern bezogen:

Ringer-Tabletten, Anaerocult, Lactose-Monohydrat, Agar-Agar, MRS-Agar und MRS-Bouillon wurden von Merck/Darmstadt bezogen. MRS steht für deMan, Rogosa und Sharp, die diesen Agar entwickelt haben. M17-Agar-Basis und M17-Bouillon-Basis stammen von der Oxoid Deutschland GmbH, Wesel. Die Cryo-Röhrchen waren von Roth/Karlsruhe. Omnifix Luer Lock und Einmal-Injektions-Kanülen Sterican wurden von B. Braun aus Melsungen bezogen.



## 4 Versuchsdurchführung

In der Zentralkäserei Mecklenburg-Vorpommern GmbH werden mesophile O-Kulturen der Firma CSK food enrichment zur Betriebssäurewecker-Herstellung verwendet. Zur Kontrolle der geforderten Eigenschaften wird neben der pH-Wert- und der Säuregrad-Messung auch die Bestimmung der Säuerungsaktivität durchgeführt. Dabei wird eine Probe Kultur in rekonstituierte Milch gegeben und für 6 Stunden bei 30 °C stehen gelassen. Dann titriert man mit 0,1 N Natriumhydroxid. Als Indikator fungiert Phenolphthalein. Die verbrauchte Menge NaOH multipliziert mit 10 entspricht dem Säuregrad. Die erhaltenen Werte entsprechen dabei des Öfteren nicht den geforderten Werten. Um den Ursachen auf den Grund zu gehen, soll ein Plaquetest für Milchsäurebakterien entwickelt werden.

Zunächst muss man herausfinden, welche Mikroorganismen in den Starterkulturen enthalten sind. Für einen erfolgreichen Versuch muss es sich um Einstammkulturen handeln. Die O-Kulturen von CSK food enrichment enthalten nur *Lactococcus lactis subsp. lactis/cremoris*. Als Referenz oder Kontrolle nimmt man *Lactococcus lactis subsp. lactis* als sogenannten Teststamm. Man kann für die Verwendung von *Lactococcus* zwei verschiedene Medien verwenden. Zum Einen das von der DSMZ vorgeschlagene Medium M17, zum Anderen das Medium MRS. Die Inhaltsstoffe der beiden Medien sind im Anhang I zu finden. Um einen Plaquetest zu entwickeln, bedarf es drei Versuche, die im Folgenden beschrieben werden.

### 4.1 Durchführung des Vorversuches

Als Erstes muss in einem Vorversuch festgestellt werden, ob der Teststamm und die zu prüfenden Starterkulturen, in diesem Fall zwei, auf den Medien wachsen. Hierzu werden Vorkulturen des Teststammes und der Starterkulturen in jedem Medium angelegt, wobei 25 ml Bouillon mit 100 µl Starterkulturen beimpft werden. Der Teststamm liegt in Tablettenform vor (siehe Abb.1). Mithilfe einer Impföse kann das Medium beimpft werden. Die Vorkultur inkubiert über Nacht bei 30 °C.



Abb. 1: Teststamm *Lactococcus lactis* in Tablettenform

Platten mit Grundagar des Mediums M17 bzw. MRS werden vorbereitet. Dann werden 100  $\mu$ l Übernachtskultur und 3 ml Weichagar gemischt und als Topagar auf den Grundagar gegeben. Weichagar stellt man her, indem man beispielsweise MRS-Bouillon ansetzt und zusätzlich Agar-Agar hinzu gibt. Die Menge sollte 60-65 % des Agar-Agar-Gehaltes vom MRS-Agar betragen. Es wird anaerob inkubiert. Obwohl Milchsäurebakterien anaerob wachsen, so sind sie doch aerotolerant, sodass man problemlos eine Flüssigvorkultur anlegen kann. Dabei wird aber der Schüttler nicht angestellt, um zusätzlichen Sauerstoffeintrag zu hemmen. Um bei der Inkubation der Platten optimales Wachstum zu ermöglichen, wird ein Anaerobtopf und Anaerocult verwendet (siehe Abb. 2). Anaerocult enthalten Sauerstoff-bindende und Kohlendioxid-erzeugende Reagenzien. Die Reaktion startet nach Zugabe von 35 ml Wasser. Die Platten werden 3 Tage bei 30 °C inkubiert.



Abb. 2: Anaerobentopf mit Anaerocult und Petrischalen

#### 4.2 Durchführung der Hauptversuche

Es muss geklärt werden, ob man einen reproduzierbaren Phagennachweis entwickeln kann und ob die Starterkulturen auf den offiziellen Phagen von *Lactococcus lactis*, den Phagen P008, reagieren. Dieser Phage gehört zur Spezies 936, einer der drei dominanten Phagengruppen unter *Lactococcus*-Phagen.

Die Herangehensweise entspricht dem Vorversuch. Zusätzlich wird eine Phagen-Verdünnungsreihe in steriler Ringerlösung angesetzt. Man stellt Grundagar-Platten her. Zu den 3 ml Weichagar und 0,1 ml Übernacht-Vorkultur gibt man bei diesem Versuch zusätzlich 0,1 ml Phagen-Verdünnung, vermischt dies vorsichtig, d.h. nicht zu stark vortexen, und gibt es auf den Grundagar. Inkubationsdaten entsprechen dem Vorversuch. Die Kontrollplatten enthalten, neben dem Grundagar, nur Weichagar und Übernacht-Vorkultur des Teststammes.

Der Versuch gilt als gelungen, wenn der offizielle Phage in der Lage ist, in den Starterkulturen und dem Teststamm, Plaques zu bilden.

Wenn dieser Versuch erfolgreich war, kann man testen, ob die verwendeten Starterkulturen eventuell von Bakteriophagen befallen sind. Man setzt je eine Vorkultur von MRS-Bouillon und M17-Bouillon mit dem Teststamm an. Die Starterkulturen werden zentrifugiert (8.000 rpm). Vom Überstand setzt man eine Verdünnungsreihe an. Man vermischt 3 ml Weichagar mit 0,1 ml Übernacht-Vorkultur und 0,1 ml Verdünnung des Überstandes und gibt dieses Gemisch auf den Grundagar. Als Kontrolle nimmt man, statt der Verdünnung des Überstandes, den offiziellen Phagen. Inkubationsdaten entsprechen den vorherigen Versuchen. Treten bei diesen Versuchen Plaques auf, kann man davon ausgehen, dass die Starterkulturen Bakteriophagen enthalten.

## 5 Ergebnisse

Im Folgenden wird zunächst das Ergebnis des Vorversuches dokumentiert. Dann werden die Testreihen der Hauptversuche dargelegt.

### 5.1 Ergebnisse des Vorversuches

Geprüft werden sollte das Wachstum der Milchsäurebakterien auf den Medien M17 und MRS. Der Teststamm zeigte auf den beiden Medien Rasenbildung. Dabei ist anzumerken, dass der Mikrobenrasen auf MRS-Agar kleine Punkte aufweist, die man in späteren Versuchen nicht mit Plaques verwechseln darf (siehe Abb. 3). Auffällig war, dass die Übernacht-Vorkultur mit MRS-Bouillon und dem Teststamm keine Trübung zeigte. Die Trübung zeigt normalerweise an, dass die Bakterien sich vermehrt haben. Trotzdem bildete sich hier ein gut sichtbarer Rasen. Auch bei den folgenden Versuchen konnte bei MRS-Bouillon plus Teststamm fast nie eine Trübung festgestellt werden.

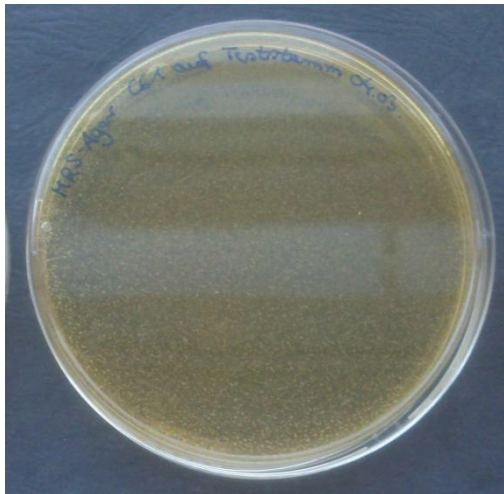


Abb. 3: MRS-Agar plus Teststamm

Die Starterkulturen C25 und C61 zeigen auf beiden Medien ebenfalls Wachstum, allerdings nicht so ausgeprägt wie der Teststamm. Somit konnte das Wachstum des Teststammes und der Starterkulturen auf den Medien M17 und MRS sicher gestellt werden.

## 5.2 Ergebnisse der Hauptversuche

Beim ersten Hauptversuch soll ein reproduzierbarer Phagennachweis entwickelt werden und es muss getestet werden, ob die Starterkulturen C25 und C61 auf den Phagen P008 reagieren.

Bei der ersten Testreihe wurde kein eindeutiges Ergebnis festgestellt. Die Kontrollplatten der Medien M17 und MRS zeigten Wachstum. Doch auch die Platten mit  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  Phagen-Verdünnung sahen fast identisch aus. Die einzigen Platten, die Veränderungen aufwiesen, waren M17 plus Teststamm. Diese Platten wiesen einen inhomogenen Rasen auf. Um ein eindeutiges Ergebnis zu erhalten, wurde eine zweite Testreihe angesetzt. Hierbei wurden einige Parameter geändert. So wurde die Menge Weichagar von 3,0 ml auf 3,5 ml erhöht, da der Weichagar oftmals schon trocknete bevor er überhaupt richtig auf der Platte verteilt wurde. Desweiteren wurden  $10^{-2}$  und  $10^{-4}$  Phagen-Verdünnungen verwendet. Die Platten mit MRS-Agar waren schwer auszuwerten, durch die bereits beschriebenen weißen Punkte. Überdies erschwerten Luft einschüsse im Agar die Auswertung. M17-Agar mit dem Teststamm lieferte auswertbare Ergebnisse. Es waren auf allen Platten kleine Löcher erkennbar, die denen des ersten Versuches entsprachen. Ihre Größe lag bei einem Durchmesser von ca. 1 mm. Besonders bei einer Platte war gut zu erkennen, wie die Phagen durch den Weichagar diffundiert sind, da auf dieser Platte die Phagen schlecht verteilt waren. In Abbildung 4 ist zu sehen, wie die Phagen von links nach rechts diffundiert sind. Grund dafür ist, dass der Topagar nicht geschüttelt wurde bevor man ihn ausgegossen hat. Laut Kutter *et al.* (2005) soll man Bakteriophagen nicht zu sehr schütteln, da sie sonst beschädigt werden könnten. Bei der Kultur C25 auf M17-Agar waren wenige kleine Plaques erkennbar. Auf Platten mit C61 waren dagegen keine Plaques erkennbar.

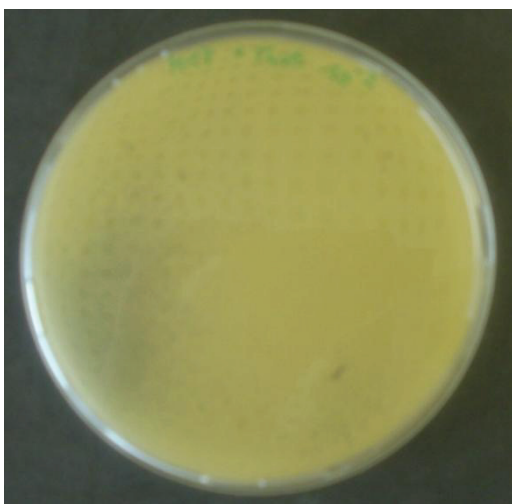


Abb. 4: Phagendiffusion in M17-Agar

In der dritten Testreihe zum ersten Hauptversuch wurden diverse Parameter geändert. Es wurde eine Übernacht-Vorkultur mit M17- und MRS-Bouillon angesetzt. Zu diesen Vorkulturen wurden 100 µl des Phagen P008 zugegeben, sodass sich die Phagen über Nacht vermehren. Von dieser Lösung wurde eine  $10^{-1}$  Verdünnung angelegt. Vom Topagar verwendete man dann entweder  $10^0$ - bzw.  $10^{-1}$ -Verdünnung. Die benutzte Menge Weichagar wurde von 3,5 ml auf 4 ml erhöht, um bessere Diffusion der Bakteriophagen zu ermöglichen. Außerdem wurde der Topagar vor dem Ausgießen gut festgehalten, damit er beim Ausgießen flüssig genug ist um ihn gut zu verteilen. Nach dem Inkubieren sind keine Plaques aufgetreten. Es konnte festgestellt werden, dass die Platten mit  $10^0$ -Verdünnung einen wesentlich dichteren Rasen aufwiesen, als die  $10^{-1}$ -Verdünnung. Dies ist in Abbildung 5 veranschaulicht. Links ist eine Platte mit MRS-Agar, dem Teststamm und einer  $10^0$ -Verdünnung zu sehen. Rechts sieht man eine Platte mit  $10^{-1}$ -Verdünnung. Auffallend ist die deutlich mattere Oberfläche der linken Platte. Es wird vermutet, dass die Vorkultur, die mit Phagen beimpft worden ist, die Ursache dieses Phänomens ist. Es könnte eine zu geringe Zeitspanne liegen zwischen Phagenbeimpfung und dem Aufbringen auf den Agar, so dass sich in der Probe mehr Bakterien befanden. Die verwendete Probe ist nicht aufgeklärt, wie das bei erfolgter Lyse zu erwarten ist. Schon das wäre ein Anzeichen für eine fehlerhafte Lyse der Bouillon. Allerdings wurde davon ausgegangen, dass sich in der Bouillon phagenresistente Bakterien durchgesetzt haben und eine nicht erfolgte Lyse nur vorgetäuscht haben. Daher ist es empfehlenswert, den Zeitpunkt der Lyse zu beobachten (Rohde, 2008). Bei allen anderen Medien und Bakterienstämmen wurde dasselbe Ergebnis erzielt. Ein weiteres Ergebnis dieses Versuches ist, dass man weniger Weichagar für die Topagarschicht nehmen sollte, da man eine relativ feste Oberfläche erzielen möchte. Bei diesem Versuch blieb auf den Platten ein Rest Flüssigkeit zurück. Dies kann eventuell zu Problemen bei der Auswertung von Testreihen führen.

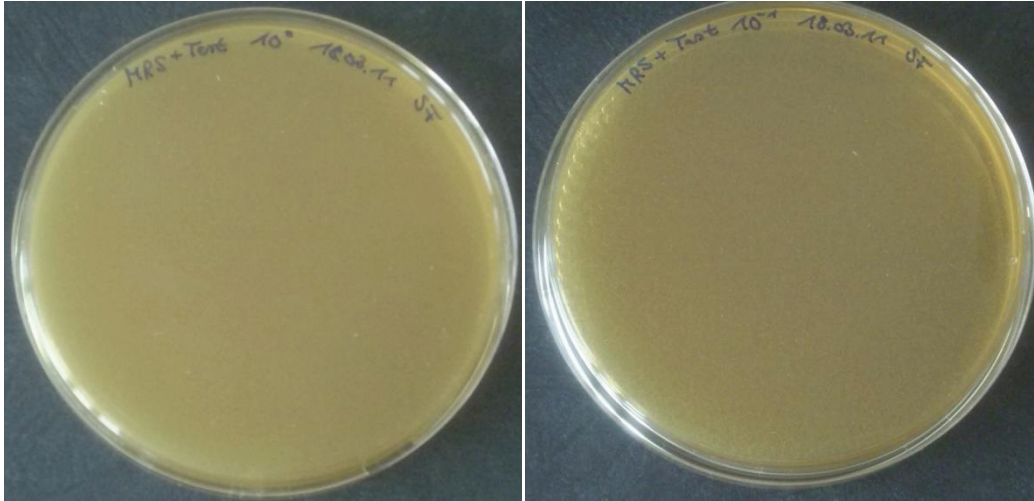


Abb. 5: Hauptversuch I: MRS-Agar plus Teststamm  $10^0$  und  $10^{-1}$

Beim zweiten Hauptversuch soll getestet werden, ob die von der Zentralkäserei verwendeten Starterkulturen Bakteriophagen enthalten. Leider konnte auf Grund nicht-eindeutiger Ergebnisse des ersten Hauptversuches und befristeter Zeitspanne für Experimente keine Testreihe durchgeführt werden, um ein Ergebnis zu erhalten.



## 6 Diskussion

Abschließend lässt sich sagen, dass noch kein Plaquetest entwickelt werden konnte, der in der Zentralkäserei Mecklenburg-Vorpommern GmbH angewendet werden kann. Dazu müssen noch einige Tests gemacht werden, die aber in der Bearbeitungszeit der Bachelorarbeit nicht geschafft wurden.

Süßmuth *et al.* (1999) beschreiben zwei Methoden um Plaquetests durchzuführen. Bei diesen Versuchen wurde eine Mischung beider Verfahren angewandt. Wie beim Oberflächenverfahren wird ein Grundagar gegossen und getrocknet und wie beim Schichtverfahren werden Wirtszellen und Phagen vor der Plattierung zusammen gegeben.

Beim Vorversuch sollte das Wachstum der Bakterien festgestellt werden. Dabei zeigte der M17-Agar eine gute Rasenbildung, bei der man in späteren Versuchen eventuelle Plaques gut entdecken kann. Beim MRS-Agar wären eventuelle Plaques schlecht zu sehen, durch das Auftreten kleiner Punkte. Wie sich jedoch bei der dritten Testreihe des Hauptversuches I gezeigt hat, kann durch Erhöhung der zugegebenen Kulturmenge von 100 µl auf 200 µl ein besseres Ergebnis erzielt werden.

Beim ersten Hauptversuch, dem Entwickeln eines reproduzierbaren Phagennachweises wurden verschiedene Parameter ausprobiert. Zunächst sollte die eingesetzte Menge Weichagar zwischen 3,0 und 3,5 ml liegen. Bei größeren Mengen bildet sich eine Flüssigkeitsschicht, die zu verfälschten Ergebnissen führen kann. Die Erhöhung der eingesetzten Kulturmenge auf 200 µl sollte auch bei diesen Versuchen angewandt werden, um ein gutes Wachstum zu gewährleisten. Für die dritte Testreihe wurde eine Übernacht-Vorkultur angelegt, die dann mit Phagen beimpft worden ist. Bei einer Wiederholung dieses Versuches sollten den Phagen mehr Zeit zur Lyse gegeben werden. Statt 24 Stunden könnte man 48 Stunden nehmen, aber man sollte trotzdem darauf achten, ob eine Klärung der Bouillon schon früher eintritt.

Beim Hauptversuch II sollten die Starterkulturen auf jeden Fall zentrifugiert werden. Das Verwenden von Filtern, um Bakterien und Phagen zu trennen, ist nicht möglich. Die Kulturproben sind zu viskos und die Filter verstopfen augenblicklich. Eine andere Herangehensweise ist die von O. Tanaka *et al.* (1994) (siehe Stand der Wissenschaft und Technik).

Bei allen Versuchen ist auf die Menge des verwendeten Weichagars für die Topagarschicht zu achten. Man sollte nicht zu viel Weichagar nehmen, um eine relativ feste Oberfläche zu schaffen. Grund dafür ist, dass man die Platten kopfüber inkubieren sollte, um Zerstörung des Mikrobenrasens durch Kondenswasser zu vermeiden. Zu fest darf der Weichagar aber auch nicht sein, da man den Phagen ermöglichen möchte, durch den Agar zu diffundieren. Desweiteren muss darauf geachtet werden, dass man den Weichagar, die Vorkultur und die Phagen-

Verdünnung schüttelt. Die Phagen nicht zu schütteln um Beschädigungen zu vermeiden, wie von Kutter *et al.* (2005) empfohlen, führt zu negativen Ergebnissen. Es sollte auf jeden Fall mit Hilfe eines Vortex geschüttelt werden, welche Stärke dabei angemessen ist, muss noch determiniert werden.

Die Zahl an Verdünnungsstufen während der Experimente ist begrenzt durch das Platzangebot im Anaerobentopf. Bei Dreifachbestimmungen ist eine große Zahl an Verdünnungen somit nicht möglich. Daher wurden für die Versuche nur zwei bzw drei Verdünnungsstufen angesetzt.

Sofern ein Plaquetest für Starterkulturen erfolgreich entwickelt worden ist, könnte man einen Schritt weiter gehen und den Test anpassen um nicht nur Starterkulturen zu untersuchen. Wie Kutter *et al.* (2005) schreiben, können Phagen überall im Betrieb vorkommen. So könnte man zum Beispiel versuchen, den Test so anzupassen, dass man rohe Milch oder Molke untersuchen kann. Dazu nutzt man den Phagen P001, der auch von der DSMZ bezogen werden kann.

## 7 Zusammenfassung

Das Thema dieser Arbeit lautet „Entwicklung eines Plaquetests zur Bestimmung von Phagentitern bei der industriellen Schnittkäseherstellung“. Für die Zentralkäserei Mecklenburg-Vorpommern GmbH soll ein Plaquetest entwickelt werden, um zu ermitteln, ob die verwendeten Starterkulturen Bakteriophagen enthalten. Es werden zwei Starterkulturen der Firma CSK food enrichment untersucht. Zur Bearbeitung des Themas benötigt man, neben den Starterkulturen, einen Bakterienstamm, der den Starterkulturen entspricht. In diesem Fall handelt es sich um *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Als Kontrollphage dient der Phage P008, der offiziell anerkannte Phage für *Lactococcus lactis*. Die Versuche werden mit den Medien M17 und MRS durchgeführt. Im ersten Schritt muss sichergestellt werden, dass der Teststamm und die Starterkulturen auf den Medien wachsen. Im nächsten Schritt muss ein reproduzierbarer Phagennachweis entwickelt werden. Außerdem muss geprüft werden, ob die Starterkulturen auf den offiziellen Phagen P008 reagieren. Wenn diese Versuche positiv ausfallen, kann man im letzten Schritt testen, ob die von der ZMV verwendeten Starterkulturen Bakteriophagen enthalten. Es ist gelungen, das Wachstum auf den Medien sicher zu stellen. Außerdem konnten erste Parameter bei der Entwicklung eines Plaquetests erfasst werden. Dies muss allerdings fortgesetzt werden, da ein reproduzierbarer Plaquetest noch nicht vollständig in der Bachelorarbeit entwickelt werden konnte.

## 8 Literaturverzeichnis

Heller, K.J.; Fieseler, L.; Loessner, M.J.: Bakteriophagen: Grundlagen, Rolle in Lebensmitteln und Anwendungen zum Nachweis sowie der Kontrolle von Krankheitserregern. Hamburg: Behr's, 2011

Kellermann, R.: Milchwirtschaftliche Mikrobiologie. 4. Aufl. Hildesheim: Heinrichs, 1972

Kutter, E.; Sulakvelidze, A.: Bacteriophages: Biology and Applications. Boca Raton: CRC press, 2005

Marks, T.; Sharp, R.: Bacteriophages and Biotechnology: a Review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 75 (2000), Nr. 1, S. 6-17

Moineau, S.; Trembley, D.; Labrie, S.: Phages of Lactic Acid Bacteria : from Genomics to Industrial Applications. ASM News 68 (2002), Nr. 8, S. 388-393

Rohde, C.: Phagenhinweise allgemein. Braunschweig: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, 2008

Süßmuth, R.; Eberspächer, J.; Haag, R.; Springer, W.: Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum. 2. völlig überarbeitete Aufl. Stuttgart: Thieme, 1999

Tanaka, O.; Ohmomo, S.; Zong, Y.; Nishiyama, K.; Doi, K.; Ogata, S.: Relationship between Fermentation Quality of Silage and Presence of Phages for Silage-Making Lactobacilli. Fukuoka, 1994

Weber, H. (Hrsg.): Milch und Milchprodukte. 2. Aufl. Hamburg: Behr's, 2006

## 9 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Teststamm <i>Lactococcus lactis</i> in Tablettenform	7
Abbildung 2: Anaerobentopf mit Anaerocult und Petrischalen	8
Abbildung 3: MRS-Agar plus Teststamm	10
Abbildung 4: Phagendiffusion in M17-Agar	11
Abbildung 5: Hauptversuch I: MRS-Agar plus Teststamm $10^0$ und $10^{-1}$	13

## Anhang I

Tab. 1: Zusammensetzung MRS-Agar

Typische Zusammensetzung	g/Liter
Pepton aus Casein	10,0
Fleischextrakt	8,0
Hefeextrakt	4,0
D(+)-Glucose	20,0
Di-Kaliumhydrogenphosphat	2,0
Tween® 80 (Polysorbat)	1,0
Di-Ammoniumhydrogencitrat	2,0
Natriumacetat	5,0
Magnesiumsulfat	0,2
Mangansulfat	0,04
Agar-Agar	14,0

Tab. 2: Zusammensetzung M17-Agar

Typische Zusammensetzung	g/Liter
Pepton	5,0
Soja-Pepton	5,0
Fleischextrakt	5,0
Hefeextrakt	2,5
Ascorbinsäure	0,5
Magnesiumsulfat	0,25
Di-Natrium-Glycerophosphat	19,0
Agar-Agar	11,0

Nach dem Autoklavieren wird dem Medium M17 10 %-ige Lactose-Lösung zugegeben.

## Anhang II

### Phage P008

Name	P008
DSM No.	10567
History	<- H. Neve, Federal Dairy Research Centre, Kiel
Mol. Weight	30 kb
Remarks	Phage P008 is accepted as the official type phage for <i>Lactococcus lactis</i> phage species 936 representing the <i>Siphoviridae</i> family of morphotype B1 and is approved by the Lactococcal and Streptococcal Phage Study Group, Bacterial Virus Subcommittee, Int. Committee on Taxonomy of Viruses; test phage in the European standard CEN/TC 216/WG3 N 42: "Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas - Test method and requirements"; virulent dsDNA phage with cohesive ends; small isometric-headed; clear plaques with sharp edges, approx. 2 mm diameter.
Host	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (DSM 4366)
Medium	M17, 30°C
Restrictions	no

### DSM 4366 - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lister 1873) Schleifer et al. 1986

Name:	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Lister 1873) Schleifer et al. 1986
DSM No.:	4366
Synonyms:	<i>Lactobacillus xylosus</i> Kitahara 1938, <i>Streptococcus lactis</i> (Lister 1873) Lohnis 1909, <i>Streptococcus lactis</i> subsp. <i>diacetilactis</i> (ex Matuszewski et al. 1936) Garvie and Farrow 1982
Information:	<- H. Neve (Federal Dairy Research Center, Kiel). [F7/2]. Host of phage P001 (DSM 4262). Utilizes citrate. See also Plasmid section. (Medium 449, 30°C).
Medium:	M17, 30°C
Supplied as:	(vacuum) dried culture (actively growing cultures available on request at an extra charge)
Risk group:	1 (classification according to German <a href="#">TRBA</a> )