

Hochschule Neubrandenburg
in Zusammenarbeit mit dem
Max Rubner-Institut
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie

Masterarbeit

„Bedeutung von Bakteriophagen aus Rohmilch für
Starterkulturen in Molkereien“



verfasst von : Christopher Burk

Studiengang: Lebensmitteltechnologie

Fachbereich : Agrarwirtschaft und
Lebensmittelwissenschaften

Betreuer: Dr. H. Neve
Prof. Dr. K. Steffens

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis2017-0702-8

Vorgelegt am : 01.06.2018

Abstract

This thesis was performed in the frame of research projects for minimizing the risk of the phage attacks in dairies. The aim was to clarify the importance of environmental bacteriophages from raw milk on starter cultures of dairies. For this purpose four *L.lactis* phages P1164, P1165, P1169 and P1173 were characterized in detail. The phages had been isolated from raw milk samples from different diaries. Their morphology, genome sequence and biological data (burst size, latency, the adsorption efficiency, phage host spectra and phage derived culture lysis) were examined in detail. It was concluded that these phages should not have a major negative impact on the starter cultures.

Abkürzungsverzeichnis

BLAST	engl.: Basic Local Alignment Search Tool
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
HTST	High Temperature Short Time
ir Kontrolle	Versuch zur irreversiblen Adsorption mit MgSO ₄ anstelle der Zellen des Wirtsstammes
ir Zellen	Versuch zur irreversiblen Adsorption mit Zellen des Wirtsstammes
<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i>
MOI	engl.: multiplicity of infection
MTP	Mikrotiterplatte
NCBI	National Center for Biotechnology
nn	nicht nachweisbar
o. D.	ohne Dimension
o/n Kultur	overnight Kultur, die Bakterienkultur ist über Nacht (ca. 15h) gewachsen, die Zellen befinden sich in der stationären Phase
RBPs	Rezeptor-bindende Proteine
re Kontrolle	Versuch zur reversiblen Adsorption mit MgSO ₄ an Stelle der Zellen des Wirtsstammes
re Zellen	Versuch zur reversiblen Adsorption mit Zellen des Wirtsstammes
rH ₂ O	zweifach entionisiertes und demineralisiertes Reinstwasser
RL	Ringerlösung
RT	Raumtemperatur
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>
ssp.	Subspezies
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
VE	Vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche

Symbolverzeichnis

h	Stunde engl.: hour
°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
g	Gramm [mol/l]
KbE	Kolonie-bildene Einheiten
kV	Kilovolt
M	Mol
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar [mmol/l]
n	Anzahl
nm	Nanometer
OD ₆₂₀	Optische Dichte bei 620 nm
PbE	Plaque-bildene Einheiten
rpm	Umdrehungen pro Minute engl.: rotation per minute
s	Sekunde
t	Zeit engl.: time

Inhalt

Abstract	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
Symbolverzeichnis.....	III
1 Einleitung	1
2 Stand der Wissenschaft.....	3
2.1 Starterkulturen in der Milchindustrie	3
2.2 Bakteriophagen.....	4
2.2.1 Morphologie	4
2.2.2 Adsorption von Phagen an <i>L. lactis</i> Zellen	5
2.2.3 Reproduktion der Phagen	7
2.2.4 Bakteriophagen der <i>L. lactis</i>	8
2.2.5 Bakteriophagen in der Milchindustrie.....	9
3 Material	10
3.1 Geräte	10
3.2 Nährmedien	11
3.3 Lösungen	12
3.4 Bakterien und Phagen.....	13
3.5 Sonstiges.....	14
4 Methoden.....	15
4.1 Kultivierungsmethoden der Bakterienstämme	15
4.2 Keimzahlbestimmung.....	15
4.3 Arbeiten mit Bakteriophagen	15
4.3.1 Spottest	15
4.3.2 Plaquetest	16
4.3.3 Phagenscreening in Rohmilchproben.....	17
4.3.4 Mikrotiterplattentest	17
4.3.5 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse	18
4.3.6 Adsorptionsversuche	19
4.3.7 One Step Growth	21
4.3.8 Lytische Anzucht von Phagen.....	22

4.3.9 Genomvergleich	22
5 Ergebnisse	23
5.1 Rohmilch Screening	23
5.2 Starterkulturen screening auf Phagensensitivität mittels MTP-Test	23
5.3 Charakterisierung der Phagen P1164, P1165, P1169, P1173	24
5.3.1 Morphologische Analyse durch Transmissionselektronenmikroskopie	24
5.3.2 Genomvergleiche	26
5.3.3 Plaquetest-Bilder	30
5.3.4 Adsorptionsversuche	31
5.3.5 One Step Growth-Versuche	36
5.3.6 Lytische Anzucht.....	39
6 Auswertung und Diskussion.....	42
7 Zusammenfassung.....	45
8 Literaturverzeichnis.....	46
9 Tabellenverzeichnis.....	51
10 Abbildungsverzeichnis.....	52
11 Formelverzeichnis	53
12 Anhang	53
13 Danksagung.....	55
14 Eidesstattliche Erklärung.....	56

1 Einleitung

Laut der „Food and Agriculture Organization“ betrug im Jahr 2016 die weltweite Milchproduktion 817 Millionen Tonnen. In deutschen Molkereien bedeutet das, bei einer produzierten Menge von circa 32,6 Millionen Tonnen, einen Umsatz von circa 26 Milliarden € im Jahr 2014 (www.dlg.org, 2018). Bis 2025 soll die Produktion von Milchprodukten um rund 20 % steigen (Fernández, et al., 2017). Um weiterhin das Potenzial und den Aufschwung dieses Industriezweiges zu nutzen, wird verstärkt nach Störfaktoren gesucht, um die Produktionsverluste und Produktionsausfälle so gering wie möglich zu halten. Die Produktionsausfälle werden unter anderem durch von Bakteriophagen verursachte Fermentationsfehler hervorgerufen. Diese Fehler beschreiben einen signifikanten Anteil von bis zu 10 % an den Ausfällen und Verlusten in der Milchprodukteproduktion (Fernández, et al., 2017; Bogosian, 2006). Die Phagen zerstören die eingesetzten Milchsäurebakterien der Starterkulturen und rufen dadurch Fehler in Geschmack und Geruch sowie Fehler in der Konsistenz und in den Erscheinungsbildern der Produkte hervor (Fernández, et al., 2017). Um diesen Ausfällen entgegen zu wirken müssen die Phagentypen sowie die Wege, wie diese in die Produkte hineingelangen, erkannt, charakterisiert und typisiert werden (Rousseau, 2009).

Ein großes Problem stellt die hohe Thermoresistenz der Phagen dar. Sie können somit die Pasteurisation der Milch überleben (Heller, et al., 2011). Folglich ist sicher, dass Rohmilch als Hauptquelle für neue Phagen in milchverarbeitenden Unternehmen gilt. Auch wenn in der Rohmilch nur geringe Titer vorliegen können die Phagen sich schnell vermehren und eine stabile Phagenpopulation bilden (Madera, et al., 2004). Es sollten daher Kontrollmechanismen und Phagenmonitoring in Molkereien durchgeführt werden, was zu einer frühzeitigen Erkennung von Fermentationsfehlern durch Phagen führen kann (Rousseau & Moineau, 2009; Quibroni et al., 2010). Um dieses Monitoring durchführen zu können, beschäftigt sich das Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Instituts in Kiel intensiv mit Bakteriophagen in der Milchindustrie.

In einem aktuellen Forschungsprojekt sollen Grundlagen geschaffen werden um den Unternehmen Werkzeuge bereitzustellen, mit denen sie schnell und effizient Phagen in niedrigen Konzentrationen in Milke nachweisen können. Im Rahmen dieses Projektes wurden bereits 52 Rohmilchproben von verschiedenen Molkereien aus ganz Deutschland auf Bakteriophagen untersucht. Etwa 40 % dieser Proben waren mit Phagen belastet. Außerdem fand eine erste Charakterisierung der aus den Rohmilchproben isolierten Phagen statt. Es wurden das Wirtsspektrum, die morphologischen Eigenschaften, sowie die thermische Stabilität ermittelt.

Zusätzlich wurde ein Genomvergleich durchgeführt (Meersteiner, 2017).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen soll die Arbeit von Meersteiner weitergeführt werden, indem die isolierten Phagen genauer charakterisiert werden. Dadurch soll die Frage geklärt werden, welche Bedeutung diese Phagen in der Rohmilch auf die Starterkulturen der Molkereien besitzen können. Zu diesem Zweck wird das Rohmilch-Screening fortgesetzt und verschiedene Starterkulturen auf deren Phagensensitivität überprüft. Es werden außerdem vier Phagen auf ihre Wurfgröße sowie deren Adsorptionsverhalten und das Lytischeverhalten untersucht. Ein Genomvergleich soll die Klassifizierung der Phagen bestätigen.

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Starterkulturen in der Milchindustrie

„Starterkulturen sind Präparate lebender Mikroorganismen oder ihrer Ruheformen, deren Stoffwechselaktivität im Fermentationssubstrat Lebensmittel erwünschte Wirkungen hervorruft“ (Eisenbrand & al., 2010). Sie finden sich in Produkten wie Joghurt, Käse, Butter und Sauermilch wieder. Hier sind die Kulturen für die Aromabildung und die Säuerung der Produkte oder auch für die CO₂- Bildung zuständig (Krämer, 2007).

Man unterscheidet zwischen Einstammkulturen und Mehr- bzw. Vielstammkulturen (Bockelmann, et al., 2005). Einstammkulturen sind oftmals sehr phagenanfällig, deshalb werden für die Produktion von Milchprodukten zumeist Mehrstammkulturen ausgewählt. Der Vorteil bei Mehrstammkulturen ist, dass Fermentationsstörungen durch Phageninfektionen aufgrund resistenter Kulturen ausgeglichen werden können (Neve, et al., 1995). Häufig finden die Gattungen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* und *Streptococcus* ihren Einsatz in solchen Mehrstammkulturen (Krämer, 2007). Die folgende Tabelle 1 zeigt anhand einiger Beispiele, wie Mehrstammkulturen zur Herstellung von Käse zusammengesetzt sein können.

Tabelle 1: Mehrstammkulturen für die Käseherstellung (Heller & Neve, 2016).

Kulturentyp	Zusammensetzung der Kultur	Funktion
O- Kultur	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	schnelle, starke Säuerung wenig Aroma
D- Kultur	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	schnelle, starke Säuerung mehr Aroma als O-Kultur CO ₂ - Bildung für Lochbildung
L- Kultur	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	schwache Säuerung
DL- Kultur	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Aromaprofilverbindung der D- und L- Kulturen

2.2 Bakteriophagen

Bakteriophagen, kurz Phagen, sind Viren, die wirtsspezifisch Bakterien infizieren und aufgrund der Art ihrer Vermehrung diese Wirtszelle zerstören. Sie sind ubiquitär und bilden die größte sich reproduzierende biologische Einheit auf der Erde (Ackermann, 2007).

Die Phagen wurden erstmals 1915 von Twort und d'Herelle unabhängig voneinander entdeckt. D'Herelle beschrieb seinen Fund als eine Art unsichtbaren Mikroorganismus (MO) der antagonistischen Wirkungen gegen Shiga-Bazillen aufweist. Er beobachtete klare Stellen in Bakterienkulturen von genesenden Diarrhoe-Patienten (Bünnige, 2014). Die ersten Phagen die genauer charakterisiert worden sind, sind die Phagen des Bakteriums *Escherichia coli* (Rohde & Sikorski, 2011).

2.2.1 Morphologie

Phagen werden insgesamt in sieben Morphotypen unterschieden (siehe Abbildung 1), wobei die Phagen der Milchsäurebakterien infizierenden Stämme zu der Gruppe der *Caudovirales* gehören (Mills, et al., 2011; Ackermann & Eisenstark, 1974). Diese werden weiterhin in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe ist die Gruppe der *Myoviridae* mit kontraktilen Schwänzen (A). Die zweite Gruppe bilden die Phagen mit nichtkontraktilen Schwänzen (B), sie wird *Siphoviridae* genannt. In diese Gruppe lassen sich auch die Phagen der *S. thermophilus* Stämme einordnen (Mills, et al., 2011). Die dritte Gruppe, die *Podoviridae*, bilden Phagen mit kurzen, nichtkontraktilen Schwänzen (C) (Ackermann & Eisenstark, 1974; Ackermann, 2007). Ferner können Phagen in weitere Gruppen eingeteilt werden, abhängig von ihrer Kopfform und der Schwanzlänge (Ackermann & Eisenstark, 1974).

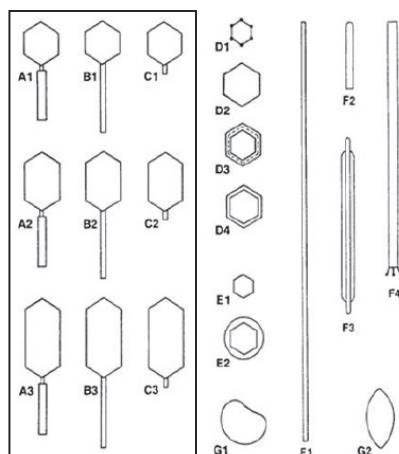


Abbildung 1: Einteilung der Bakteriophagen nach Morphotypen in sieben Klassen, A-C geschwänzte Phagen, D- E polyedrische Phagen, F filamentöse Phagen, G pleomorphe Phagen (Ackermann, 2007), gekennzeichnete Phagen: Gruppen der *L. lactis* und *S. thermophilus* Phagen.

Anhand der Abbildung 2 lässt sich der Grundaufbau eines Bakteriophagen erkennen. Ein Phage besteht aus einem „Kopf“, welcher durch eine Proteinhülle und dem darin enthaltendem genetischem Erbmaterial gebildet wird. Das genetische Erbmaterial kann in Form von einzel- oder doppelsträngiger RNA oder DNA vorliegen. Bei den *Myoviridae*-Phagen ist an den Kopf der „Phagenschwanz“ gebunden, welcher ebenfalls aus Proteinen aufgebaut ist. Er lässt sich in zwei Abschnitte gliedern, das innere „Schwanzrohr“ und die „Schwanzscheide“, welche sich im Rahmen der Replikation bei der DNA-Injektion zusammen ziehen kann. An die Schwanzspitze schließt sich die „Basisplatte“ an. Diese Organelle trägt die Rezeptorbindeproteine (RBP), welche für die Adsorption wichtig sind (Spinelli, et al., 2014). Außerdem befinden sich an der Platte die „Schwanzfasern“ (Fiber). Manche Phagen besitzen außerdem „Spikes“, welche zur besseren Haftung bei dem Adsorptionsvorgang an die Wirtzelle, dienen (Ackermann, 2007).

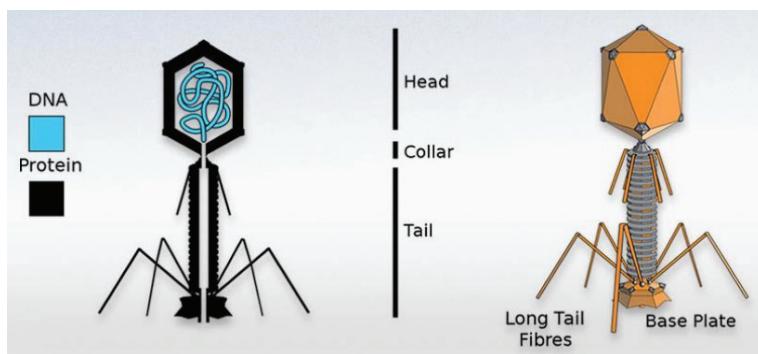


Abbildung 2: Charakteristische Morphologie eines *Myoviridae*-Bakteriophagen (Bünninge, 2014).

2.2.2 Adsorption von Phagen an *L. lactis* Zellen

Jeder Phage kann nur an eine begrenzte Anzahl an Wirtszellen adsorbieren (Wittman, 2018). Um den Adsorptionsvorgang einzuläuten muss ein Phage auf eine Wirtszelle treffen. Dies passiert z.B. durch Diffusion ist also ein rein zufälliger Vorgang, wobei die Phagen sich nicht aktiv und zielgerichtet bewegen können (Heller, et al., 2011). Trifft nun ein *Myoviridae*-Phage auf eine Zelle, wird die Oberfläche der Zelle durch die langen Schwanzfasern abgetastet um sicherzustellen, dass es sich nicht nur um ein Rezeptormolekül handelt. Dieser Vorgang ist reversibel. Handelt es sich um eine Wirtszelle, so wird die Basisplatte an die Oberfläche abgesenkt und es entsteht zwischen der Basisplatte und der Zelloberfläche eine irreversible Bindung. Die Basisplatte ist somit entscheidend für die Infektion, da hier die meisten RBP lokalisiert sind. Bisher ist noch nicht genau geklärt, an und durch welche Verbindungen die Phagen sich an die Zellen binden.

Es wird vermutet, dass bei grampositiven Zellen Lipoteichonsäure und Polypeptidglykan und bei gramnegativen Polysaccharide als Rezeptoren für die RBP fungieren. Jedoch können damit die

unterschiedlichen Affinitäten der Phagen nicht hinreichend erklärt werden (Spinelli, et al., 2014; Heller, et al., 2011). Denn 2010 wurde entdeckt, dass *L. lactis* von einem „Pellicle-Häutchen“ umgeben ist, welches sich von allen bakteriellen Polysacchariden unterscheidet (Chapot-Chartier & al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Mutanten des Stammes *L. lactis*, welchen dieses Häutchen fehlte nicht von den eigentlich spezifischen Phagen befallen werden können. Das lässt darauf schließen, dass diese Struktur maßgeblich an dem Adsorptionsvorgang beteiligt ist (Spinelli, et al., 2014). Außerdem ist erwiesen, dass nicht alle RBP für die Bindung zwischen Phage und Zelle zur Verfügung stehen. Es reichen zwar wenige Rezeptoren aus um eine Verbindung herzustellen. Bevor jedoch diese spezifische Bindung zustande kommt, muss eine Bindung den Phagen in der Nähe der Zelle halten, sodass die Zellwand durch die Schwanzfasern nach geeigneten Rezeptoren abgesucht werden kann.

In der folgenden Abbildung 3 sind die beschriebenen Mechanismen vereinfacht dargestellt. Es wird gezeigt, wie sich die Spezifität des Phagen auf die Adsorption auswirkt, von nicht spezifisch (B) bis spezifisch (D). Außerdem wird das erwähnte Pellicle-Häutchen (A) des *L. lactis* abgebildet (Spinelli, et al., 2014).

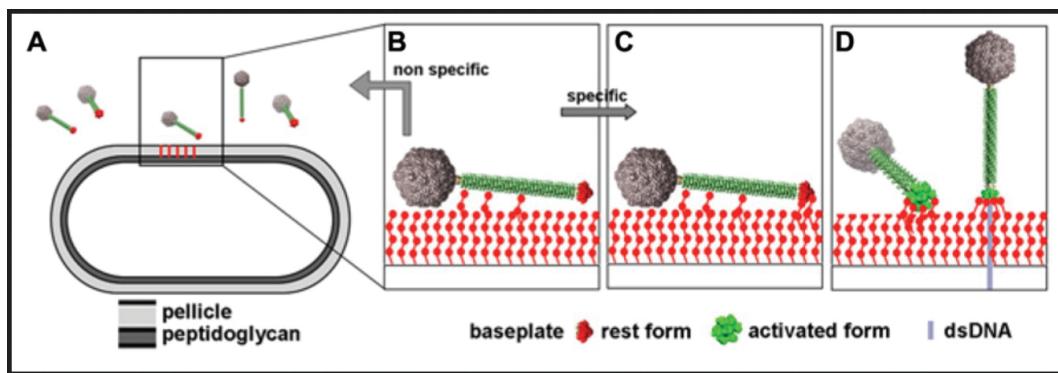


Abbildung 3: spezifischer Adsorptionsmechanismus eines p2 Phagen an *L. lactis*, (A) unspezifische Adsorption durch das Pellicle-Häutchen des *L. lactis*, (B) bis (D) zunehmende Spezifität des Phagen und dadurch Adsorption an die Zelloberfläche des *L. lactis* (Spinelli, et al., 2014).

Zudem wurde ermittelt, dass Phagen eine Art Aktivierungsmechanismus besitzen welcher als „Sicherheitsschalter“ fungiert. Dadurch wird eine stabile Konformität nur dann ermöglicht, wenn die physikochemischen Bedingungen denen der Wirtzelle entsprechen. Das bedeutet, es gibt eine „ready-to-adsorb“-Konformation der Basisplatte, welche manche Phagen erst ausbilden müssen (Spinelli, et al., 2014).

2.2.3 Reproduktion der Phagen

Für Phagen ist ein geeigneter Wirt für ihre Replikation unerlässlich, da sie sich nur an bestimmte Zellen binden können und ihre Reproduktion somit auf ebendiese limitieren. Um den Vermehrungsprozess einleiten zu können, muss der Phage an die metabolisch aktive Zelle binden, das heißt er muss adsorbieren. Nach der Adsorption erfolgt der Reproduktionsprozess bei dem die in dem Phagenkopf enthaltene Erbinformation in die Wirtszelle injiziert wird (siehe Abbildung 3 (D)). In der Folge gibt es zwei Wege, zum einen den durch virulente Phagen ausgelösten lytischen Zyklus. Dieser führt zu neuen Phagen, die wiederum selbst Wirtszellen befallen können. Hierbei wird die Erbinformation des Wirtes zerstört und damit der Stoffwechsel der Zelle zugunsten des Phagen verändert. Die Zelle bildet nun neue Phagenproteine und setzt diese zu neuen Phagen zusammen. Durch den steigenden Zellinnendruck und durch die Aktivität der Phagenlysine initiierte Lyse der Zellwand, kommt es zur Freisetzung der neugebildeten Phagen. Dabei ist die Wurfgröße (burst size), also die Anzahl der freigesetzten Phagen pro Zelle, kohärent zum Typus des Phagen. Sie reicht von drei bis mehreren hundert. Dabei ist Latenzzeit, die Zeit von der Adsorption bis zur bakteriellen Zelllyse, eine wichtige Größe (Heller, et al., 2011; Campbell, 2015; Wang, 2006).

Der lysogene Zyklus hingegen, ausgelöst durch temperante Phagen, führt zu Prophagen. Besitzt eine Zelle einen Prophagen, so ist diese vor der Infektion von anderen Phagen geschützt. Durch die Zellteilung des Wirtes wird folglich auch die Vermehrung der Prophagen im Genom ermöglicht. Der lysogene Wirt stirbt dabei nicht. Erst durch äußere Einwirkungen, wie z.B. Stress verursacht durch Umweltveränderungen, kommt es zum Wechsel in den lytischen Zyklus. Die folgende Abbildung 4 stellt die beiden Zyklen schematisch dar (Campbell, 2015; Heller, et al., 2011; M.B., 2018).

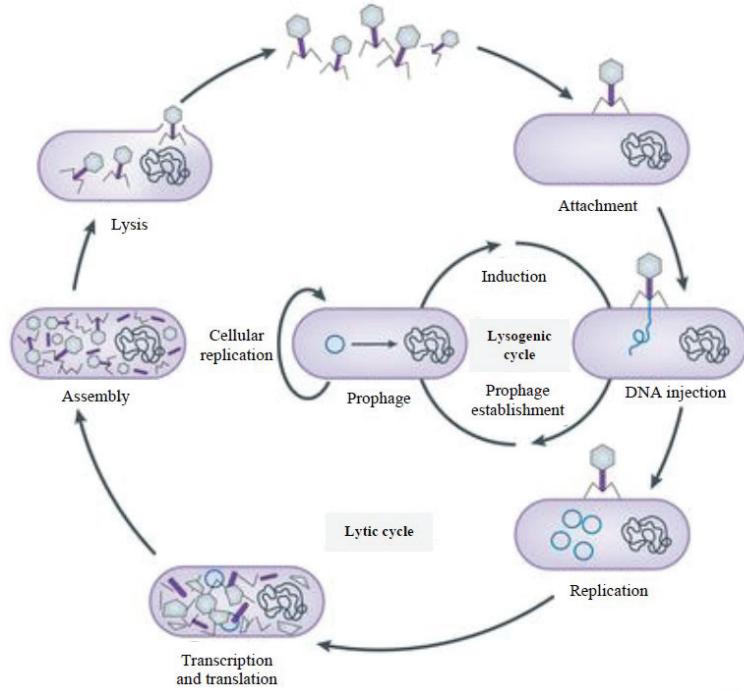


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Reproduktionszyklen von Bakteriophagen. Durch äußere Einflüsse kann der lysogene Zyklus (großer Kreis) in den lytischen Zyklus (kleiner Kreis) übergehen (Salmond & Fineran, 2015).

2.2.4 Bakteriophagen der *L. lactis*

Die *L. lactis* Phagen sind in zehn Gruppen eingeteilt, diese werden in der folgenden Abbildung 5 gezeigt. Die mit rot gekennzeichneten Phagen sind die am häufigsten vorkommenden Phagen unter den *L. lactis* infizierenden Phagen. Bis auf die Gruppe des „P335“ sind alle Phagen virulent. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden vier Phagen, aus den von Meersteiner (2017) identifizierten Rohmilchphagen, zur weiterführenden Charakterisierung ausgewählt. Dabei handelt es sich um die Phagen P1164, P1165 und P1169 welche sich der P335-Untergruppe BK5-T (Untergruppe I) zuordnen lassen. Der vierte Phage ist der P1173, dieser lässt sich der Phagengruppe 949 zuordnen.

In Folge einer ersten Charakterisierung konnte die limitierende Thermostabilität der P335-Untergruppe BK5-T (Untergruppe I), welche eine Temperatur von über 65°C nicht überleben, nachgewiesen werden (Meersteiner, 2017).

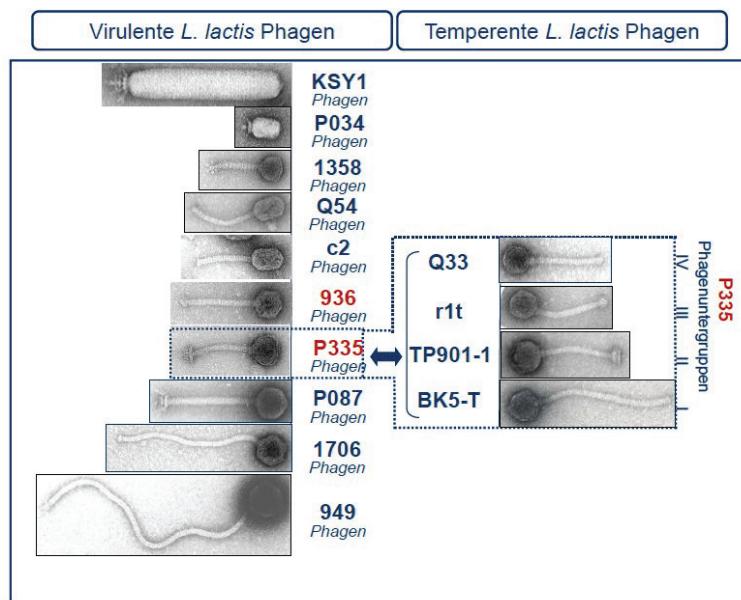


Abbildung 5: Klassifizierung der *L. lactis* Phagen in zehn Gruppen. Die Phagengruppe P335 ist in vier Untergruppen aufgeteilt. Diese gehören den temperenten Phagen an. Die mit rot gekennzeichneten Phagengruppen sind die am häufigsten auftretenden *L. lactis* infizierende Phagengruppen (Josephsen & Neve, 2004; Deveau, et al., 2006).

2.2.5 Bakteriophagen in der Milchindustrie

Phagen werden unter anderem durch unsterile Produktionsbedingungen oder durch die Rohmilch selbst in die Molkereien eingetragen (Heller, et al., 2011). Dies führt zu signifikanten Fermentationsstörungen und Produktionsausfällen (Fernández, et al., 2017). Trotz geringer Ausgangskonzentrationen der Phagen in Rohmilch bauen sich mit zunehmender Produktionsdauer immer höhere Titer auf, was auf eine hohe Replikationsrate der Phagen zurückzuführen ist (Madera, et al., 2004). Dies kann zum gesamten Zelltod der Starterkulturen führen. Bei dem Einsatz von Molke, z.B. bei der Käseherstellung, ist dies besonders gefährlich, da die Phagen sich in der Molke anreichern können, ohne sichtbare Säuerungsstörungen hervorzurufen. Daher sollten die Molkeprodukte lange und hoch erhitzt werden, um eine Phagenkontamination auszuschließen. Untersuchungen zeigen jedoch, dass Phagen auch hohe Temperaturen von bis zu 140°C überleben können und eine Produktionsführung von High Temperature Short Time (HTST) nicht ausreicht um diese thermostabilen Phagen zu inaktivieren. Der Phage P1532 überlebt Temperaturen von circa 145°C (Heller, et al., 2011).

3 Material

Die folgenden Tabelle 2 bis Tabelle 7 zeigen die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Nährmedien, Lösungen, Bakterien und Phagen sowie sonstige verwendete Gegenstände und Software. Eine ausführliche Chemikalienliste mit dazugehörigen Herstellern findet sich im Anhang (vgl. Tabelle 16).

3.1 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Typ	Hersteller	Modell
Analysewaage	Sartorius	1801
Bedampfungsanlage	Baltec	MED20
Brutschrank	Heraeus Instruments	B12
Clean Bench	Berner International GmbH	Flow Safe, B- [Max-Pro] ²
Eismaschine	Scotsman, Frimont S.p.A. Pogliano MIL	AF 100 AS
Herdplatte	Schott	Ceran
Hochsequenziergerätes	Illumina	MiSeq
Kamera- Inline- Mikroskop	SIS Olympus	Megaview G2
Library preparation	Illumina	Illumina Nextera XT Kit
pH- Meter	Mettler Toledo	340
Photometer	Macherey- Nagel GmbH & Co. KG	Nanocolor 500 D
Schüttler	Bender und Hobein AG	Vortex Genie 2
Transmissionselektronenmikroskop	Fei Company	Tecnai 10
Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH	MC
Zentrifuge groß	Beckmann Coulter	J2-21
Zentrifuge klein	Eppendorf- Zentrifuge	5417R
Reinstwasseranlage	Sartorius AG	Arium pro VF

3.2 Nährmedien

In dieser Arbeit wurde mit dem Komplexmedium-M17 (Terzaghi & Sandine, 1981), zur Kultivierung der *L. lactis* Stämme, gearbeitet. Diesem Medium wurde nach separatem Autoklavieren bei 121 °C für 20 min. Lactose hinzugesetzt, da in dieser Arbeit ausschließlich mit Lactose-positiven Kulturen gearbeitet wurde. Bei der Herstellung des LM17-Unterschichtagars entfällt diese Zugabe, da für dieses Medium eine separate Zuckerlösung hergestellt wurde. Bei den Nährmedien wurden die festen Bestandteile mittels Magnetrührer in vollentsalztes Wasser (VE-Wasser) und bei den Lösungen in zweifach entionisiertem Wasser (rH_2O) gelöst und anschließend bei 121 °C für 20 min. autoklaviert.

Tabelle 3: Verwendete Nährmedien

Medium	Menge	Zusammensetzung
LM17-Flüssignährmedium (Terzaghi & Sandine, 1981)	5g 5 g 2,5 g 5 g 0,5 g 5 g 19 g 0,25 ml 1 ml 1000 ml	Phytone- Peptone Poly-Peptone Yeast-Extrakt Beef-Extrakt Ascorbinsäure Lactose Na-β-Glycerophosphat $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1 M CaCl_2 VE-Wasser
M17-Oberschichtagar	7,5 g 5 g 5 g 2,5 g 5 g 0,5 g 19 g 1 ml 1000 ml	Bacto-Agar Phytone-Peptone Poly-Peptone Yeast-Extrakt Beef-Extrakt Ascorbinsäure Na-β-Glycerophosphat 1 M MgSO_4 VE-Wasser
LM17-Unterschichtagar	940 ml 1,5 % 60 ml	LM17-Boullion Agar-Agar Zuckerlösung (Lactose)

Zuckerlösung für Unterschichtagar	5 g Lactose/Glucose 10 ml 1 M CaCl ₂ 50 ml VE-Wasser
Nährmedium Mikrotiterplatten-Test	100 ml Magermilch 20 ml Ellikerbouillon 1 ml Bromkresolpurpur
HGL-Milch	100 g Magermilch 10 g Glucose 3 g Yeast- Extrakt 25 ml Lackmuslösung 975 ml VE-Wasser

3.3 Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Lösungen

Lösung	Menge	Zusammensetzung
CaCl ₂ -Lösung (1M / 100 mM)	14,7 g / 1,47 g ad 100 ml	CaCl ₂ x 2 H ₂ O rH ₂ O
Glycin-Lösung (10 % / 3 %)	10 g / 3 g + 90 ml / 97 ml	rH ₂ O nach dem Lösen, steril filtrieren (0,2 µm)
Ringerlösung (¼ stark)	2 Stück 1000 ml	Ringertabletten rH ₂ O
Verdünnungslösung	900 ml 100 ml 1 ml	¼ starke Ringerlösung LM17-Medium 1 M CaCl ₂
R1/ 1M NaCl	8 ml 2 ml	Ringerlösung 5 M NaCl
10 mM MgSO ₄	0,1 ml 9,9 ml	1 mol/ l MgSO ₄ rH ₂ O
Magermilch	100 g 900 ml	Magermilchpulver rH ₂ O

3.4 Bakterien und Phagen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme (Tabelle 5) sind aus der institutseigenen Stammsammlung entnommen worden. Die verwendeten Phagen (Tabelle 6) wurden von Meersteiner (2017) aus Rohmilchproben isoliert.

Tabelle 5: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Spezies	Referenz
3107	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Institutssammlung
Bu2-60	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar diacetylactis	Institutssammlung
F7/2	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar diacetylactis	Institutssammlung
ML8	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Institutssammlung
RK1	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar diacetylactis	Institutssammlung
Wg2	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Institutssammlung
UC509.9	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Institutssammlung
Lc1	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	Institutssammlung
Lc2	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	Institutssammlung
Lc3	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	Institutssammlung
Lc4	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	Institutssammlung

Tabelle 6: Verwendete Phagenisolate

Phagenisolat	Wirtsstamm	Spezies	Referenz
P1154*	3107,Wg2	<i>L. lactis</i>	(Meersteiner, 2017)
P1162*	3107,Wg2	<i>L. lactis</i>	(Meersteiner, 2017)
P1164	3107,Wg2	<i>L. lactis</i>	(Meersteiner, 2017)
P1165	3107,Wg2	<i>L. lactis</i>	(Meersteiner, 2017)
P1166*	3107,Wg2	<i>L. lactis</i>	(Meersteiner, 2017)
P1169	3107,Wg2	<i>L. lactis</i>	(Meersteiner, 2017)
P1170	3107,Wg2	<i>L. lactis</i>	(Meersteiner, 2017)
P1173	3107,Wg2, ML8, Bu2-60, RK1, Lc1, Lc2, Lc3, Lc4	<i>L. lactis</i>	(Meersteiner, 2017)

* ausschließlich bei Rohmilchscreening und MTP-Test verwendet

3.5 Sonstiges

Tabelle 7: sonstige verwendete Materialien

Typ	Hersteller	Name
Diagramm Software		SigmaPlot13
Eppendorfpipetten	Eppendorf	
Genomvergleich	NCBI	BLASTN 2.8.0
Glasglimmerplatte	Plano	
Glaspipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & KG	1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml
Peleusball	VWR	
Pipettenspitzen	SurPhob, Biozym Nerbeplus	1250 µl, 10 µl 100 µl
Software Annotierung		RAST
Software Assemblierung		Geneious 10
Sterilfilter	Schleicher & Schüll	FP30/0,20 & 0,45 µm, CA-S Filtereinheit

4 Methoden

4.1 Kultivierungsmethoden der Bakterienstämme

Für die Kultivierung der mesophilen *L. lactis* Stämme wurde ein Inokulum 2%-ig im LM17-Flüssignährmedium angeimpft und über Nacht (circa 12 h) bei einer Temperatur von 30°C inkubiert (o/n Kultur).

Außerdem erforderten einige Versuche eine spätlogarithmische Tageskultur. Dazu wurde LM17-Flüssignährmedium mit einem mesophilen *L. lactis* Stamm 2%-ig angeimpft und anschließend bis zu einer optischen Dichte von $OD_{620} = 0,3$ bzw. 0,5 wachsen gelassen.

4.2 Keimzahlbestimmung

Die Keimzahlbestimmung wurde im Koch'schen Plattengussverfahren durchgeführt. Zunächst wurde eine dezimale Verdünnungsreihe der Bakterienprobe erstellt. Die Probe wurde anschließend auf einer mit LM17-Unterschichtagar beschichteten Platte ausgestrichen und für 48 h bei 30°C inkubiert. Danach konnten die Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) ausgezählt und die Keimzahl mittels der Formel: $\frac{c}{(n_1*1+n_2*0,1)*d}$ bestimmt werden.

4.3 Arbeiten mit Bakteriophagen

4.3.1 Spottest

Durch den Spottest konnte eine erste Abschätzung des Phagentiters vorgenommen werden, welcher anschließend mit einem Plaquetest genauer bestimmt worden ist. Außerdem diente der Spottest zum Nachweis und zur Ermittlung des Wirtsspektrums der Phagen in Rohmilch. Dazu wurde in einem kleinen Reagenzglas 0,4 ml 100 mM CaCl₂ mit 0,1 ml 3 %-iges Glycin und 0,3 ml Tageskultur gemischt. Anschließend wurden 3 ml M17-Oberschichtagar hinzugegeben, auf einer Platte mit Unterschichtagar gegossen und verteilt. Zur Abschätzung des Phagentiters wurde eine serielle dezimale Verdünnungsreihe erstellt und anschließend 2 x 100 µl Probe nebeneinander auf den getrockneten Agar pipettiert. Zum Nachweis von Phagen wurden die Proben aus dem Aliquote der aufbereiteten Rohmilchproben (vgl. 4.3.3 Phagenscreening in Rohmilchproben) ohne Verdünnung direkt aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von circa 12 h bei 30°C im Brutschrank konnten die Platten auf Lysezonen untersucht werden.

4.3.2 Plaquetest

Der Plaquetest diente zur Titerbestimmung der Phagen. Zunächst wurde eine serielle dezimale Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Phagen erstellt. Hierbei richtet sich die maximale Verdünnungsstufe nach dem zu erwartenden Phagentiter, welcher zuvor durch einen Spotttest bestimmt worden ist. Anschließend wurde in einem kleinen Reagenzglas 0,1 ml 100 mM CaCl₂, 0,1 ml Phagenverdünnung und 0,3 ml Tageskultur gemischt und bei Raumtemperatur (RT), zur Adsorption, für 10 min. inkubiert. Danach wurden 0,1 ml 3 %-iges Glycin, 0,3 ml 100 mM CaCl₂ und 3 ml M17-Oberschichtagar in das kleine Reagenzglas hinzugegeben, gemischt und auf einer mit LM17-Unterschichtagar beschichteten Platte ausgegossen. Die folgende Inkubation fand bei umgedrehten Platten für circa 12 h bei 30°C statt.

Nach der Inkubation konnten die Plaques ausgezählt werden. Zur Auswertung wurden Platten von zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen betrachtet. Dabei sollten die auszuwertenden Platten mindesten 10 und maximal 300 Plaques aufweisen. Platten die nicht in diesem Bereich lagen wurden zu der Auswertung hinzugezogen aber bei der Ermittlung des Titers nicht berücksichtigt. Zur Ermittlung des Phagentiters wurde folgende Formel (1) verwendet.

$$\text{Phagentiter} = \frac{c}{(n_1 * 1 + n_2 * 0,1) * d} \quad (1)$$

c = Summe der gezählten Plaques aller Platten, die für die Auswertung herangezogen werden

n₁ = die Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen werden

n₂ = die Anzahl der Platten der nächst höheren Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen werden

d = der Kehrwert der Verdünnung der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe, hierbei handelt es sich um die auf n₁ bezogene Verdünnungsstufe

4.3.3 Phagenscreening in Rohmilchproben

In dieser Arbeit wurden 27 Rohmilchproben aus unterschiedlichen norddeutschen Molkereien auf Phagen untersucht. Um die Proben für den Spottest nutzbar zu machen wurden die Proben zunächst zu Molke aufbereitet. Das heißt die Rohmilchproben wurden mittels 10%-iger Milchsäure auf einen pH- Wert von 4,6 eingestellt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei RT und konstantem Schwenken, wurden die Proben bei 4°C und 12.000 rpm (Beckman Coulter J2-21/ Rotor JA-20) für 20 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit einem 0,45 µm Sterilfilter filtriert. Die so präparierten Proben wurden mittels Spottest auf Phagen geprüft. Dazu wurden folgende *L. lactis* Stämme verwendet: UC509.9, F7/ 2, Bu2-60, 3107, RK1, ML-18, Lc1 und Lc2.

4.3.4 Mikrotiterplattentest

Der Mikrotiterplattentest diente zur Ermittlung der Phagensensitivität verschiedener Starterkulturen, welche in Tabelle 8 dargestellt sind. Dazu wurden die Mikrotiterplatten (MTP) mittels einer Mehrkanalpipette mit 0,2 ml Nährmedium je Kavität gefüllt. Als Nährmedium wurde ein Magermilchgemisch aus Magermilch Ellikerbouillon und Bromkresolpurpur eingesetzt. Mit einem abgeflammten Impfstempel wurden die zu testenden Starterkulturen zur Revitalisierung in das Nährmedium jeder einzelnen Kavität überimpft und für circa 12 h im Brutschrank bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde aus dieser Mikrotiterplatte eine neue Mikrotiterplatte mit frischem Nährmedium angeimpft und die Phagen ebenfalls mit einem Impfstempel in die Kavitäten übertragen. Dabei konnte auf einer Mikrotiterplatte 52 Starterkulturen gleichzeitig getestet werden. Außerdem wurde immer eine Kontrollplatte ohne Phageninfektion mitgeführt. Diese Platte wurde bei der Auswertung des Tests als Referenz genutzt. Nach einer anschließenden Inkubationszeit von circa 12 h bei einer Temperatur von 25 °C konnten die Platten ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgte durch das Erkennen eines Farbumschlags, welcher durch den Metabolismus der Bakterien von Milchzucker zu Milchsäure entsteht. Durch diese Säuerung schlägt der enthaltende Indikator Bromkresolpurpur von blau zu gelb um. War kein Farbumschlag zu verzeichnen, deutete dies auf eine Phagenaktivität hin, da die Bakterien sich wahrscheinlich nicht oder in zu geringer Konzentration vermehrt hatten. Ein grünlicher Farbumschlag deutete auf ein verzögertes Wachstum der Bakterien hin. Das Ergebnis wurde immer zuerst mit der Kontrollplatte abgeglichen. War in den Kavitäten der Kontrollplatte ebenfalls kein Farbumschlag zu erkennen, deutete dies auf eine grundlegende Inaktivität der Wirtsstämme hin. Bei einem positiven Befund wurde zur Bestätigung des Ergebnisses ein Spottest durchgeführt.

Die Phagen P1154, P1162, P1164, P1165, P1166, P1169, P1170 und P1173 wurden zur Überprüfung der Starterkulturen eingesetzt. Es wurde also zusätzlich zu den in dieser Arbeit charakterisierten vier Phagen weitere Phagen getestet.

Tabelle 8: Screening von Starterkulturen auf Phagensensitivität mittels Mikrotiterplattentest

Mikrotiterplatte	Stämme pro Platte	Spezies
1	3 x 8	<i>L. lactis</i> (Starterkultur)
	3 x 7	
	3 x 12	
2	26	<i>L. lactis</i>
3	2 x 26	<i>L. lactis</i> (Isolate aus fermentierten Milchprodukten)
4	2 x 26	<i>L. lactis</i>
5	43* ¹	<i>L. lactis</i> (Institutssammlung)
6	52	<i>L. lactis</i> (Starterkultur)
7	52	<i>L. lactis</i> (Starterkultur)
8	52	<i>L. lactis</i> (Starterkultur)
9	52	<i>L. lactis</i> (Starterkultur)
10	52	<i>S. thermophilus</i>
11* ²	52	<i>S. thermophilus</i>
12* ²	52	<i>S. thermophilus</i>
13* ²	52	<i>S. thermophilus</i>
14* ²	52	<i>S. thermophilus</i>
15* ²	52	<i>S. thermophilus</i>

*¹ Einsatz von HGL-Milch als Nährmedium

*² ausschließlich den Phagen P1165 getestet

4.3.5 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse

Die Untersuchung mittels Transmissionselektronenmikroskops (TEM) ermöglichen eine morphologische Einteilung der Phagen. Außerdem kann dadurch die Adsorption der Phagen an Zellen veranschaulicht werden. Die Untersuchungen der Phagen wurden mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops (TEM) (Tecnai 10, FEI Company, Eindhoven, Niederlande) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV durchgeführt.

Zur Herstellung der Phagenpräparate wurde reine Kohle auf eine Glasglimmerplatte (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland)) aufgedampft.

Anschließend wurde die Platte mit einem Skalpell in kleine circa 3 x 3 mm Quadrate geschnitten und der Kohlefilm durch Eintauchen in 65 µl Phagenlysat auf eine Teflonplatte abgeschwemmt. Während der folgenden 10-minütigen Adsorptionszeit lagerten sich die Phagen am Kohlefilm an. Der Kohlefilm wurde anschließend in zwei Tropfen rH₂O gewaschen und in 65 µl eine 2 %-igen Uranylacetat-Lösung überführt. Diese wurde zur Phagenfixierung auf ein 400-„mesh“ Kupfernetz übertragen. Das überschüssige Uranylacetat wurde mit einem Filterpapier entfernt. Die so präparierten Phagen konnten nun in das TEM eingeschleust und mit einer CCD-Kamera (Megaview G2, Emsis Münster, Deutschland) erfasst werden. Die anschließende Bildanalyse erfolgte mit der iTEM 5.2 TEM Imaging Plattform Software (SIS Olympus). Diese Arbeit wurde von einer Labormitarbeiterin, Frau Angela Back, durchgeführt.

4.3.6 Adsorptionsversuche

Um einen Einblick zu erhalten wie schnell die Phagen sich an die Wirtszellen binden können, wurden Adsorptionsversuche durchgeführt (nach Breum, et al., 2007; Ammann, et al., 2008). Durch diese Versuche konnte die Adsorptionsrate ermittelt werden. Diese ist wichtig um Aussagen zu Lysezeiten treffen zu können, da hohe Adsorptionsraten zu einer kürzeren Lysezeit führen (Shao & Wang, 2008).

Wie bereits beschrieben, wird die Adsorption in zwei Stufen gegliedert, der reversiblen und der irreversiblen Adsorption. Die Versuche zur irreversiblen und reversiblen Adsorption sind während der ersten Versuchsschritte gleich aufgebaut. Zunächst wurde in einem 100 ml Ärmchenkolben ein LM17- Flüssignährmedium mit einer o/n *L. lactis* 3107 Kultur 2%-ig angeimpft und diese auf eine OD₆₂₀= 0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurde diese Suspension für 10 min. bei 4°C und 7000 rpm (Beckman Coulter J2-21/ Rotor JA-14) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Bei den Phagen P1164, P1165 und P1173 wurde mit LM17-Flüssignährmedium auf ein Gesamtvolumen von 1,8 ml aufgefüllt, um eine MOI von 0,1 einzustellen. Mittels dieser in Lösung vorliegenden Zellen konnte der Versuch gestartet werden.

Vorab musste der in Tabelle 9 exemplarisch dargestellte Phagenansatz pipettiert werden. Die Zusammensetzungen der anderen Phagenansätze befinden sich im Anhang (vgl. Tabelle 19).

Tabelle 9: Zusammensetzung des Phagenansatzes P1165 für Adsorptionsversuche.

Volumen	Lösung
25 µl	1 M CaCl ₂
417 µl	Phagen
1358 µl	LM17 Bouillon

Von diesem Phagenansatz wurden jeweils 400 µl und jeweils 150 µl der Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß pipettiert, welche bei 30°C für 5 min. erwärmt worden sind. Anschließend wurden aus dem Phagenansatz 350 µl in das Eppendorfgefäß mit den Zellen überführt, dabei startete sofort die Versuchszeit. Während des kompletten Versuches wurden die Proben bei 30°C geführt. Die Probenentnahme erfolgte nach einer Inkubationszeit von 0, 1, 5, 10 und 15 min. Die Proben wurden nach der Zusammenführung des Phagenansatzes und der Zellen gevortext, eine anschließende Durchmischung der Probe musste vermieden werden.

Für die nachfolgenden Schritte erfolgte eine Trennung der Versuchsdurchführung. So wurden bei der irreversiblen Adsorption jeweils 10 µl der Probe entnommen und in auf Eis gehaltener 990 µl RL/NaCL verdünnt. Nach der Versuchszeit von 15 min. verblieben die Proben auf Eis, so lange bis der Versuch der reversiblen Adsorption durchgeführt worden ist. Anschließend mussten die Proben für 1 min. bei 4°C und 14.000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5417R) abzentrifugiert werden. Aus dem Überstand wurden für den anschließenden Plaquetest 100 µl entnommen und in 900µl Verdünnungslösung verdünnt.

Bei der reversiblen Adsorption wurden 100 µl Probe entnommen und sofort für 1 min. bei 4°C und 14.000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5417R) zentrifugiert. Aus dem Überstand sind 10 µl in 990 µl Verdünnungslösung verdünnt worden und für die anschließenden Plaquetests auf Eis gehalten. Mit folgender Formel (2) konnte der prozentuale Anteil von gebundenen Phagen an Bakterienzellen errechnet werden. Im Anschluss erfolgte die Auswertung und Ergebnisdarstellung über die Software SigmaPlot 13.

Sollten dabei reversible und irreversible Adsorption eine ähnliche Verlaufskurve aufweisen so ist davon auszugehen, dass die Adsorption an die Wirtszelle als einstufiger Prozess abläuft oder das die Phagen sich so schnell irreversibel an die Wirtszellen binden, dass kein Unterschiede zu erkennen sind (Ammann, et al., 2008).

$$\text{Adsorption [\%]} = ((\text{Titer}_{\text{Kontrolle}} - \text{Titer}_{\text{Probe}}) / \text{Titer}_{\text{Kontrolle}}) * 100 \quad (2)$$

4.3.7 One Step Growth

Mit Hilfe des One Step Growth assay (nach Casey et al., 2015) wurden die Wurfgröße, sowie die Latenzzeit der Phagen bestimmt. Für die Durchführungen des Tests wurden 50 ml LM17-Flüssignährmedium aus einer o/n *L. lactis* 3107 Kultur 1 %-ig angeimpft. Diese wurde bei 30°C so lange inkubiert bis OD₆₂₀ = 0,3 erreicht war. Anschließend wurde die Suspension bei 7000 rpm (Beckman Coulter J2-21/ Rotor JA-25.50) und 4°C für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 500 µl LM17-Flüssignährmedium erneut gelöst. Anschließend wurde der Phagenansatz (Phagenlysat, LM17-Flüssignährmedium und 1 mM CaCl₂, vgl. Anhang Tabelle 17) mit einer MOI von 0,005 pipettiert. Die Bakterienzellen und der Ansatz wurden für 2 min. bei 30°C inkubiert. Danach wurden 500 µl des Phagenansatzes zu den Zellen gegeben und erneut für 10 min. bei 30°C inkubiert.

In der Folge wurden die Zellen durch eine Zentrifugation für 30 sec. bei 14.000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5417R) und 4°C von dem LM17-Flüssignährmedium getrennt und anschließend in 50 ml LM17-Flüssignährmedium aufgenommen. Daraus wurden alle 10 min. 1x 300 µl Probe entnommen. Zu dem Zeitpunkt t = 0 min. (t₀) wurden 3x 300 µl Proben (t_{0a}, t_{0b}, t_{0c}) entnommen. Die Proben t_{0b} und t_{0c} wurden für 30 sec. bei 14.0000 rpM (Eppendorf-Zentrifuge 5417R) und 4°C zentrifugiert. Die Zellen der Probe t_{0c} wurden erneut in LM17-Flüssignährmedium gelöst und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Bei der Probe t_{0b} wurde der Überstand bearbeitet. Probe t_{0a} wurde unbehandelt weiterbearbeitet. Anschließend wurde mit allen Proben eine serielle dezimale Verdünnungsreihe aufgestellt und ein Plaquetest durchgeführt. Die Zeitdauer der Probenentnahme wurde phagenspezifisch angepasst und erfolgte bis zum Erreichen des ersten Wachstumsplateaus. Dieses äußert sich durch eine Stagnation der Wachstumskurve, das heißt der Phagentiter nahm nicht weiter zu. Die Wurfgröße wurde ermittelt indem die Anzahl freigesetzter Phagen nach Versuchsende durch die Anzahl an infizierten Zellen zurzeit t₀ geteilt wurde. Daraus folgt die nachstehende Formel.

$$\text{Wurfgröße} = \frac{\text{Titer after Burst} - t_0}{\text{Phage added} - t_0} \quad (3)$$

t₀ = Phagentiter zum Zeitpunkt 0 min.

4.3.8 Lytische Anzucht von Phagen

Durch die lytische Anzucht können Informationen über das Lyseverhalten der Phagen gegenüber den Wirtsstämmen gewonnen werden. Es wurde ermittelt wie viel Zeit die Phagen benötigen um bei anzunehmenden optimalen Bedingungen den Wirtsstamm am Wachstum zu hindern. Dazu wurde die optische Dichte der wachsenden Kultur bei 620 nm gemessen.

Es wurden 0,1 ml unverdünntes Phagenlysat mit 0,1 ml 100 mM CaCl₂ und einer o/n *L. lactis* Kultur 3107 gemischt. Die Volumina der Bakterienkultur wurde für eine MOI = 0,01 entsprechend angepasst. Dies erfolgte mit Hilfe der folgenden Formel (4). Als Beispiel dient hier die Berechnung für den Phagen P1173 die anderen Phagenanstätze sind im Anhang dargestellt (vgl. Tabelle 18).

$$\text{MOI } X = \frac{2,3 * 10^7 \text{ in } 0,1 \text{ ml}}{1,8 * 10^9 \text{ in } 0,1 \text{ ml}} \quad X = 0,013 \text{ bei } 0,1 \text{ ml Zugabe von "3107"} \quad (4)$$

Diese Ansätze wurden für 10 min. bei RT inkubiert und anschließend mit 5 ml LM17-Flüssignährmedium gemischt. Direkt im Anschluss erfolgte die erste optische Dichtemessung bei OD₆₂₀, weitere Messungen wurden alle 30 min. durchgeführt. Während der gesamten Messzeit wurden die Proben bei 30 °C inkubiert. Die Messungen wurden nach circa 6 h gestoppt und eine letzte Messung erfolgte nach circa 24 h. Bei allen Versuchen wurde eine Kontrolle mitgeführt, welche nicht phageninfiziert war.

4.3.9 Genomvergleich

Um die morphologische Einordnung der Phagen auch auf Genomebene zu bestätigen, wurde ein Genomabgleich mit verwandten Phagen durchgeführt. Für diesen Abgleich wurde die von NCBI bereitgestellte Datenbank BLASTN, 2.8.0 verwendet (Altschul, et al., 1997). Dazu mussten die Phagen-Genome mittels des Hochsequenziergerätes Illumina MiSeq sequenziert werden. Die erforderlichen genomischen Libraries wurden mittels Nexterae XT Kit erstellt. Mit Hilfe des Programmes Geneious 10 wurden die Genome anschließend zusammengesetzt und durch RAST annotiert. Die Auswertung, das heißt das Erstellen der Grafiken ist durch das Programm Artemis comparison tool erfolgt.

5 Ergebnisse

5.1 Rohmilch Screening

Es konnte durch die eingesetzten Wirtsstämme keine Phagen in den 27 Rohmilchproben nachgewiesen werden.

5.2 Starterkulturen screening auf Phagensensitivität mittels MTP-Test

Die Ergebnisse des MTP-Tests sind ebenfalls negativ ausgefallen, wobei einige Wachstumshemmungen und -verzögerungen auf den MTP, siehe Abbildung 6, festgestellt worden sind. Diese konnten jedoch durch einen anschließenden Spotttest nicht verifiziert werden. Das folgende Beispiel zeigt auf der linken Seite ein Kontrollplatte und auf der rechten Seite eine mit dem Phagen P1173 infizierte Platte. Die schwarzen Punkte kennzeichnen Wachstumsausfälle der Kultur, die schwarzen Schrägstriche kennzeichnen Wachstumshemmungen. In diesem Fall sind vier Wachstumsausfälle und vier Wachstumsverzögerungen festzustellen.

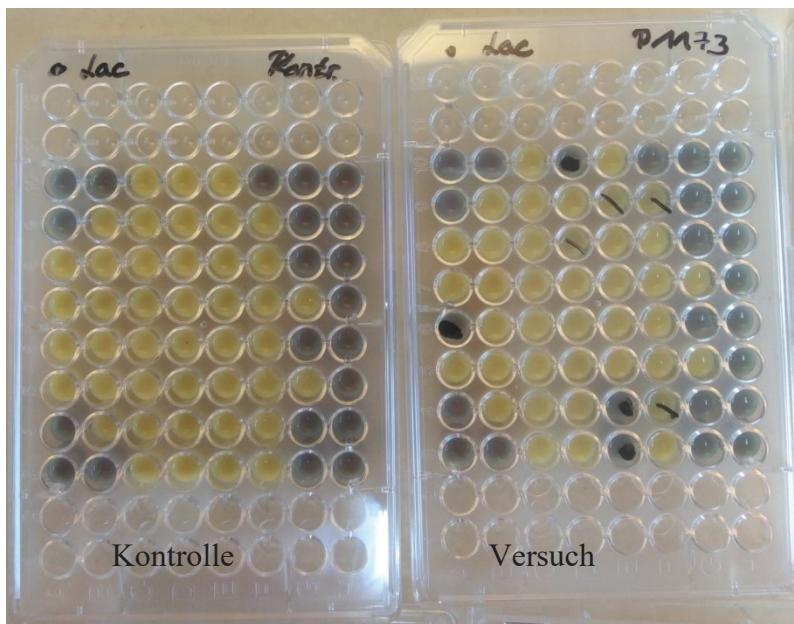


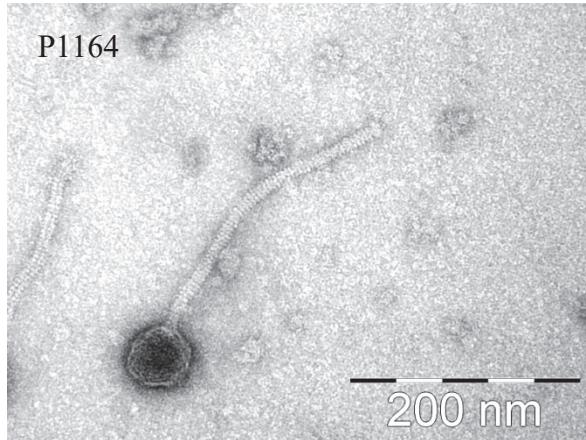
Abbildung 6: Mikrotiterplatten mit *Lactococcus lactis*, ohne Phageninfektion (links, Kontrolle), mit Phageninfektion des P1173 (rechts, Versuch), Inkubationszeit circa 12 h bei 30°C.

5.3 Charakterisierung der Phagen P1164, P1165, P1169, P1173.

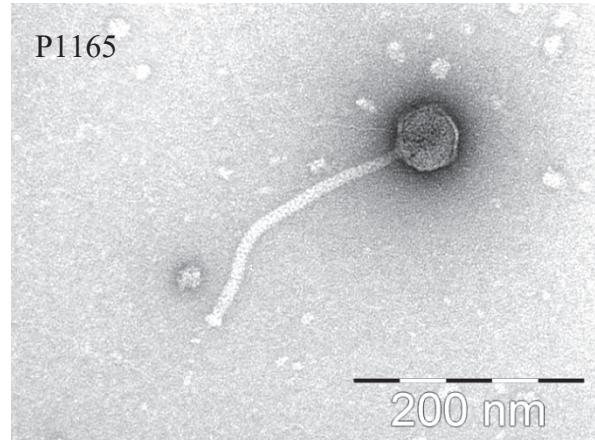
Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sollen die vier *L. lactis* Phagen P1164, P1165, P1169 und P1173 genauer charakterisieren. Es erfolgt zunächst eine Einteilung in die *L. lactis* Phagentaxonomie durch die morphologische Analyse mittels TEM. Durch einen Genomabgleich sollen diese Ergebnisse bestätigt werden. Anschließend soll die zentrale Frage geklärt werden, ob die Phagen einen Einfluss auf die Starterkulturen und deren Fermentationsvorgänge in Molkereien haben können. Dazu werden die Adsorptionsrate, die Wurfgröße und das Lytischeverhalten genauer betrachtet.

5.3.1 Morphologische Analyse durch Transmissionselektronenmikroskopie

Die Abbildung 7 und Abbildung 8 zeigen die TEM-Aufnahmen der Phagen P1164 (links) und P1165 (rechts) in 160.000-facher Primärvergrößerung. Sie besitzen einen ähnlich großen isodiametrischen Kopf mit einem Durchmesser von circa 58,7 nm und eine an dem Schwanz sitzende Basisplatte. Sie zeigen Unterschiede in der Schwanzlänge auf. Der Phage P1165 besitzt mit einer Länge von 224,8 nm einen kürzeren und schmaleren Schwanz als der Phage P1164 mit einer Länge von 258,6 nm. Die dazu in der folgenden Tabelle 10 dargestellten Maße sind aus mehreren Messungen ermittelte Durchschnittswerte.



**Abbildung 7: TEM- Aufnahme des Phagen P1164,
Aufnahme bei einer 160.000-fachen
Primärvergrößerung.**



**Abbildung 8: TEM- Aufnahme des Phagen P1165,
Aufnahme bei einer 160.000-fachen
Primärvergrößerung.**

Tabelle 10: Durchschnittliche Abmessungen, mit Standardabweichung, der morphologischen Merkmale der Phagen P1164 (11 Messungen) und P1165 (3 Messungen).

	P1164	P1165
Kopfdurchmesser	$58,7 \pm 1,7$ nm	$57,15 \pm 2,2$ nm
Schwanzlänge	$258,6 \pm 5,7$ nm	$224,8 \pm 15,8$ nm
Schwanzbreite	$12,5 \pm 0,3$ nm	$10,6 \pm 0,81$ nm
Schwanzfiberlänge	$155,2 \pm 2,4$ nm*	vorhanden**

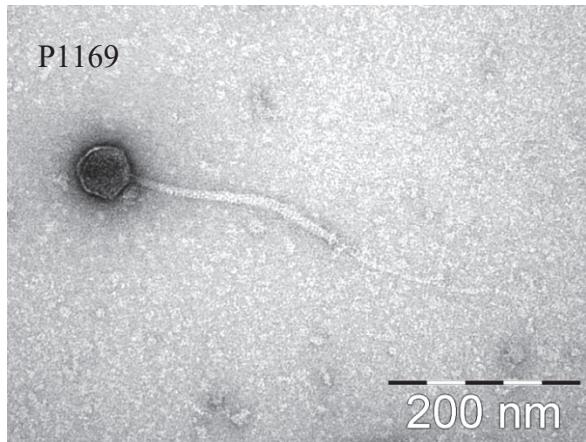
* es erfolgten 3 Messungen

** es konnten keine Fiber vermessen werden

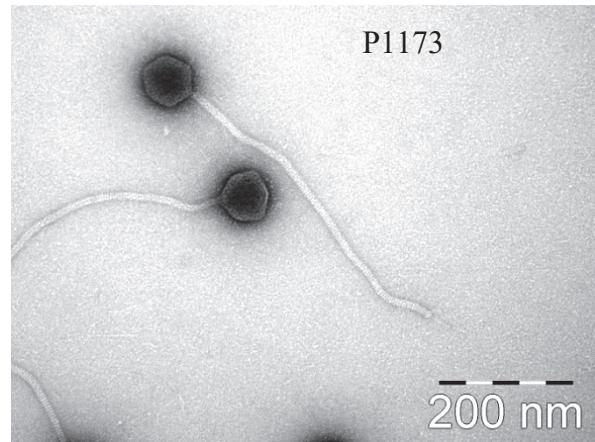
Die TEM-Aufnahmen der Phagen (links) P1169 und (rechts) P1173 sind in Abbildung 9 und Abbildung 10 gezeigt. Die dazugehörigen Maße sind in Tabelle 11 dargestellt.

Der Phage P1169 besitzt einen gleich großen isodiametrischen Kopf mit einem Durchmesser von 58,1 nm wie die Phagen P1164 und P1165 und weist in der Schwanzlänge mit 227,0 nm ähnlich Werte wie der Phage P1165 auf.

Der Phage P1173 besitzt einen größeren isodiametrischen Kopf mit einem Durchmesser von 81,8 nm als die zuvor beschriebenen Phagen P1164, P1165 und P1169. Außerdem weist er als weiteres Unterscheidungsmerkmal einen längeren Schwanz von 506,1 nm auf.



**Abbildung 9: TEM- Aufnahme des Phagen P1169,
Aufnahme bei einer 135.000-fachen
Primärvergrößerung.**



**Abbildung 10: TEM- Aufnahme des Phagen P1173,
Aufnahme bei einer 93.000-fachen
Primärvergrößerung.**

Tabelle 11: Durchschnittliche Abmessungen, mit Standardabweichung, der morphologischen Merkmale der Phagen P1169 (8 Messungen) und P1173 (23 Messungen)

	P1169	P1173
Kopfdurchmesser	$58,1 \pm 1,1$ nm	$81,8 \pm 2,8$ nm
Schwanzlänge	$227,0 \pm 3,9$ nm	$506,1 \pm 8,0$ nm
Schwanzbreite	$11,5 \pm 0,47$ nm	$13,7 \pm 0,5$ nm
Schwanzfiberlänge	$162,9 \pm 24,46$ nm	$65,5 \pm 6,0$ nm

5.3.2 Genomvergleiche

Für die Vergleiche der Phagen auf Genomebene mit deren nächsten Verwandten sind diese sequenziert und mit der Datenbank BLASTN 2.8.0 abgeglichen worden. Die Ergebnisse wurden grafisch zusammengetragen und in Abbildung 11 dargestellt. Es werden die zu charakterisierenden Phagen (in der Mitte, umrahmt) und deren nächsten verwandten Phagen abgebildet. Dabei stellen die orangenen Pfeile die Genomkarten des jeweiligen Phagen dar. Durch die blauen Bereiche werden die prozentualen Übereinstimmungen im Genom gekennzeichnet, wobei dunkelblau eine 100 %-ige und hellblau eine 69 %-ige Übereinstimmung zeigt. Anhand dieser Darstellung ist zu erkennen, dass die Phagen P1164 und P1169 geringfügige Ähnlichkeiten zu deren nächsten verwandten *L. lactis* Phagen UL36.k1, P335 und 53802 aufweisen. Außerdem zeigt der P1169 eine geringe Kongruenz zu dem *S. thermophilus* Phagen 9871. Dies wird auch durch die Werte der Tabelle 12 und Tabelle 13 bestätigt. Der Phage P1173 hingegen weist eine 81 %-ige Übereinstimmung mit dem *L. lactis* Phagen 949 auf. Auffallend ist, dass die nächsten Verwandten 9871 und CHPC577 des P1165 Phagen zu den *S. thermophilus* Phagen gehören. Diese weisen sowohl in der grafischen als auch in der tabellarischen Auswertung eine geringe Übereinstimmung auf.

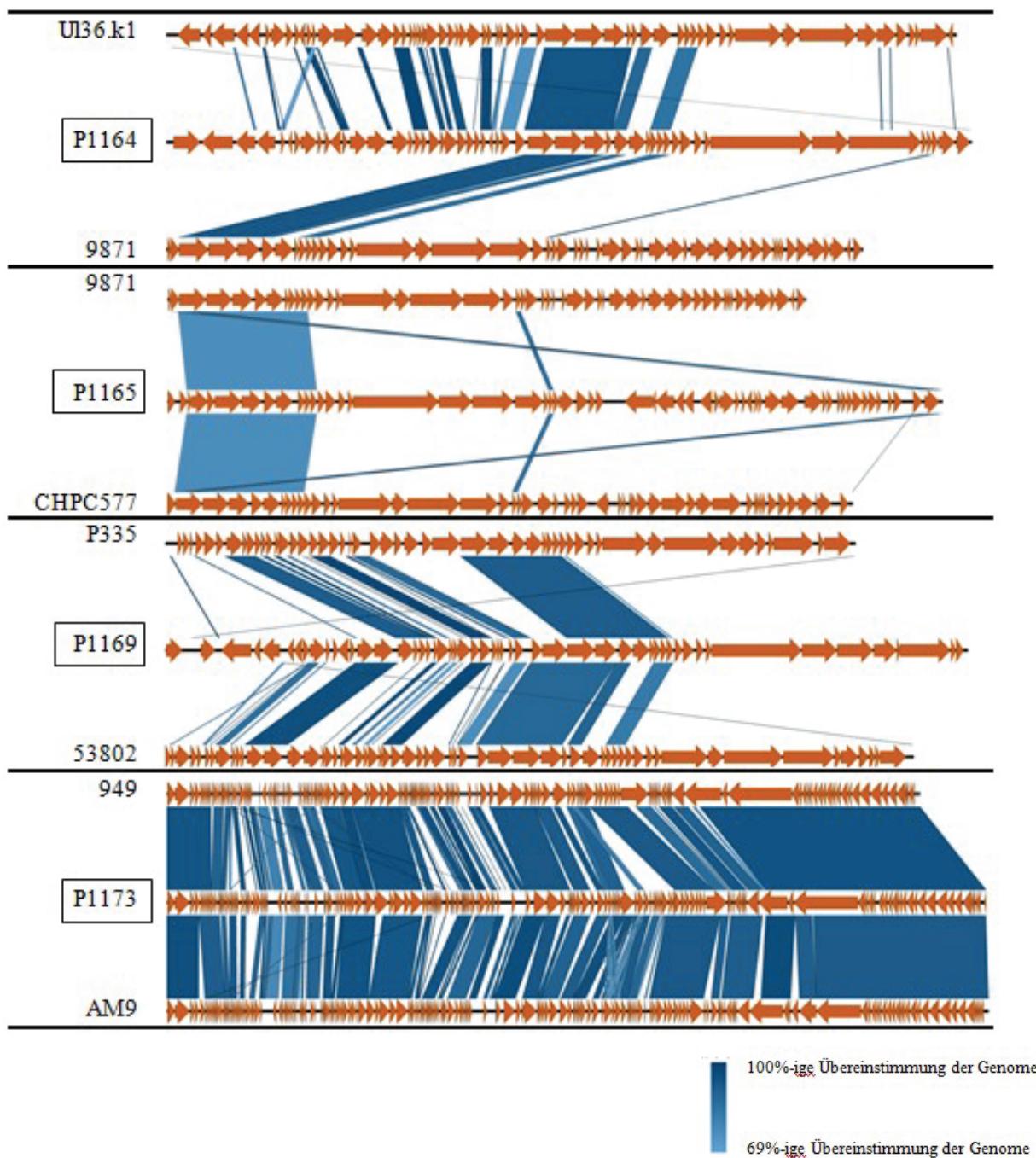


Abbildung 11: Genomvergleich der Phagen P1164, P1165, P1169 sowie P1173 und den nächsten Verwandten, blaue Bereiche markieren Analogien im Genom, wobei dunkelblau einer 100%-igen Übereinstimmung entspricht.

Tabelle 12: Ergebnisse der BLASTN-Analyse des Phagen P1164 und P1165, Darstellung der nächsten Verwandten, der prozentualen Übereinstimmung und der prozentualen Angabe der Identität auf Nukleotidebene (BLASTN, 2.8.0).

Phage	Nächste Verwandte	Cover	E value	Ident.	Referenz
		query [%]		[%]	
P1164	<i>L. lactis</i> Phage 63301	17	0.0	90	(Oliveira, et al., 2016)
	<i>L. lactis</i> Prophagengenom (nicht identifiziert)	28	0.0	94	(Muhammed & Vogensen, 2018)
	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> SK11	39	0.0	94	(Makarova, et al., 2006)
	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> JM3	39	0.0	94	(Kelleher, et al., 2017)
	<i>L. lactis</i> Phage ul36	27	0.0	94	(Labrie & Moineau, 2002)
	<i>S. thermophilus</i> Hybrid-Phage 9871	15	0.0	91	(McDonnell, et al., 2016)
P1165	<i>S. thermophilus</i> Phage CHPC577	20 %	0.0	90 %	(Szymczak, et al., 2016)
	<i>S. thermophilus</i> Hybrid-Phage 9871	20 %	0.0	90 %	(McDonnell, et al., 2016)
	<i>S. thermophilus</i> Phage 9873	20 %	0.0	90 %	(McDonnell, et al., 2016)
	<i>S. thermophilus</i> Phage 9873	20 %	0.0	90 %	(McDonnell, et al., 2016)
	<i>S. thermophilus</i> Phage 9874	20 %	0.0	90 %	(McDonnell, et al., 2016)
	<i>S. thermophilus</i> Phage CHPC926	20 %	0.0	89 %	(Szymczak, et al., 2016)
	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> Stamm JM4	19 %	0.0	89 %	(Kelleher, et al., 2017)

Tabelle 13: Ergebnisse der BLASTN-Analyse des Phagen P1169 und P1173, Darstellung der nächsten Verwandten, der prozentualen Übereinstimmung und der prozentualen Angabe der Identität auf Nukleotidebene (BLASTN, 2.8.0).

Phage	Nächste Verwandte	Cover	E value	Ident.	Referenzen
		query [%]		[%]	
P1169	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> Stamm JM3	38 %	0.0	92 %	(Kelleher, et al., 2017)
	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> Stamm SK11	38 %	0.0	92 %	(Makarova, et al., 2006)
	<i>L. lactis</i> Prophagengenom (nicht identifiziert)	24 %	0.0	92 %	(Muhammed & Vogensen, 2018)
	<i>L. lactis</i> Phage P335	24 %	0.0	92 %	(Labrie, et al., 2008)
	<i>L. lactis</i> Phage P63301	14 %	0.0	90 %	(Oliveira, et al., 2016)
P1173	<i>L. lactis</i> Phage P949	81 %	0.0	93%	(Samson & Moineau, 2010)
	<i>L. lactis</i> Phage phiL47	87 %	0.0	89 %	(Cavanagh, et al., 2014)
	<i>L. lactis</i> Phage AM2	87 %	0.0	91 %	(Mahony, et al., 2017)
	<i>L. lactis</i> Phage AM8	87 %	0.0	91 %	(Mahony, et al., 2017)
	<i>L. lactis</i> Phage AM3	87 %	0.0	91 %	(Mahony, et al., 2017)
	<i>L. lactis</i> Phage AM1	87 %	0.0	91 %	(Mahony, et al., 2017)

5.3.3 Plaquetest-Bilder

Um eine ganzheitliche Beschreibung der Phagen vornehmen zu können, soll im Folgenden auf die charakteristischen Plaques eingegangen werden. Dazu zeigen die nachfolgenden Abbildung 12 bis Abbildung 15 die typischen klaren Zonen, die bei einer mit Phagen infizierten Kultur entstehen. Abbildung 12 und Abbildung 13 zeigen die Plaquemorphologie der Phagen P1164 (links) und P1165 (rechts). Sie weisen durchsichtige runde Löcher im Bakterienrasen mit einem klar abgegrenzten Rand auf. Es sind keine anderen Auffälligkeiten festzustellen.

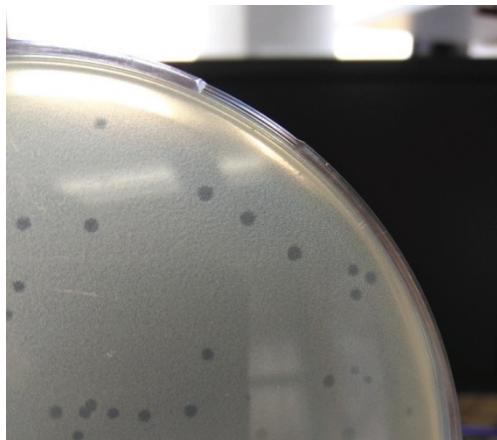


Abbildung 12: klare Plaques des Phagen P1164/
Titer = $1,9 \cdot 10^7$ / Verdünnungsstufe = 10^{-5} .

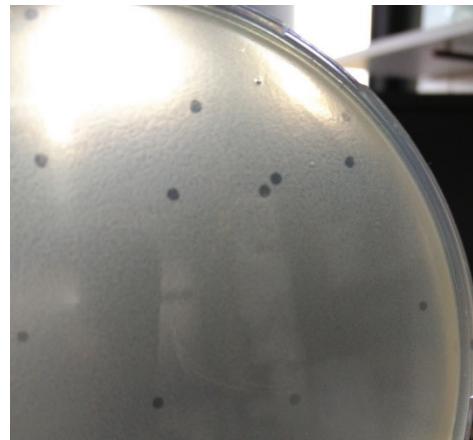


Abbildung 13: klare Plaques des Phagen P1165/
Titer = $4,8 \cdot 10^7$ / Verdünnungsstufe = 10^{-6} .

Die folgenden Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen Aufnahmen der Plaques der Phagen P1169 (links) und P1173 (rechts). Hervorzuheben sind hierbei die Plaques des Phagen P1173. Er bildet einen milchigen Hof um den klar abgegrenzten inneren Plaque, den sogenannten „Halo“. Diese werden durch sehr aktive phagenkodierte Lysine verursacht, die die Zellwand der Wirtsbakterien aufbrechen und die extrazelluläre Polymeren Substanzen (EPS) des Wirtsstammes auflösen (Deveau, et al., 2003; Hughes, et al., 1999). Der Phage P1169 weist im Gegensatz zu den anderen Phagen sehr kleine Plaques auf. Die Plaques sind klar von dem Bakterienrasen abgegrenzt.

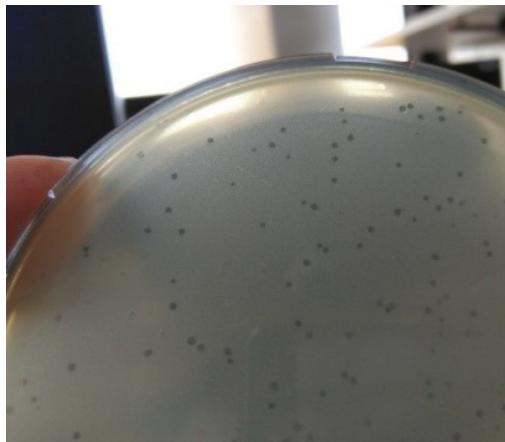


Abbildung 14: kleine, klare Plaques des Phagen P1169/ Titer = $1,1 \cdot 10^8$ / Verdünnungsstufe = 10^{-5} .

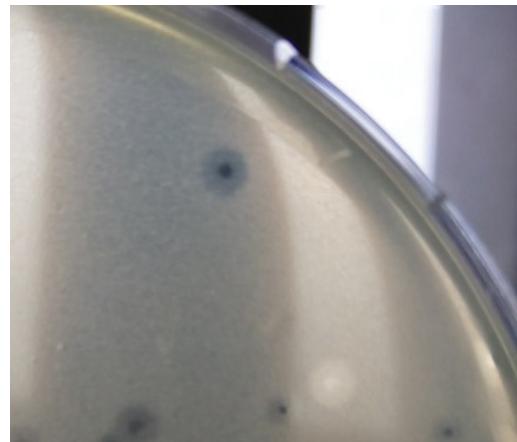


Abbildung 15: große, in der Mitte klare Plaques des Phagen P1173 mit milchigem Halo/ Titer = $2,4 \cdot 10^7$ / Verdünnungsstufe = 10^{-5} .

5.3.4 Adsorptionsversuche

Für eine bessere Gegenüberstellungsmöglichkeit der Adsorptionsraten wurden die Ergebnisse der Versuche in Tabelle 14 zusammengefasst. Ferner wurden TEM-Aufnahmen des Adsorptionsvorganges zur Veranschaulichung des Adsorptionsvorganges hinzugefügt (siehe Abbildung 20 bis Abbildung 23). Es ist zu sehen, dass alle Phagen unterschiedliche Adsorptionskinetiken aufweisen. Der Phage P1173 weist eine schnelle irreversible Adsorption gegenüber den anderen Phagen auf. Nach 0 min. sind bereits 81,9 % irreversibel gebunden. Außerdem werden nach 15 min. fast 100 % adsorbiert, wobei bei den Phagen P1164 und P1169 nur circa 96 % irreversibel binden. Ferner weisen die Phagen P1164, P1165 und P1169 erst nach 5 min. eine Adsorptionsrate von circa 94 % auf. Auffällig ist hier, dass der Phage P1165 nach 1 min. bereits 44,9 % irreversible gebunden hat.

Bei der reversiblen Adsorption ist auffallend, dass die Adsorptionsraten bei 0 min. über dem der irreversiblen Adsorptionsrate liegen. Normalerweise sollten die Raten bei 0 min. auf einem gleichen Level liegen, zumal die Ausgangskonzentration der Phagen nahezu identisch war, sowohl bei der irreversiblen, als auch bei der reversiblen Adsorption. Vermutet wird, dass in diesem Fall die Adsorption sehr schnell geschieht.

Tabelle 14: reversible und irreversible Adsorptionsraten der Phagen P1164, P1165, P1169 und P1173 zu den Zeitenpunkten 0, 1, 5, 10, 15 min.

Zeit [min]	Phage	Adsorptionrate [%]		Phage	Adsorptionrate [%]	
0	P1164* ¹	reversible	irreversible	P1165* ²	reversible	irreversible
		77,9 %	5,9 %		63,6 %	7,6 %
		88,8 %	18,8 %		74,1 %	44,9 %
		95,5 %	92,6 %		97,2 %	94,7 %
		96,9 %	95,9 %		98,4 %	98,5 %
		97,5 %	96,3 %		98,5 %	99,0 %
1	P1169* ³			P1173* ⁴		
		84,6 %	11,0 %			
		84,3 %	2,1 %			
		96,0 %	94,1 %			
		98,0 %	96,8 %			
		97,8 %	95,8 %			

*¹ 3-fach-Bestimmung *² 2-fach-Bestimmung *³ 2-fach-Bestimmung

*⁴ 1-fach-Bestimmung/ keine ausreichenden Ergebnisse für Auswertung der reversiblen Adsorption

Die folgenden Diagramme zeigen die Verlaufskurven der reversiblen (re) und irreversiblen (ir) Adsorption der Phagen P1164, P1165, P1169 und P1173. Hierbei wird der Phagentiter in PbE/ml in Abhängigkeit der Zeit in min. dargestellt. Außerdem werden die Standardabweichungen mit angezeigt. In allen Diagrammen ist zu erkennen, dass die Kontrollen einen konstanten Phagentiter aufweisen. Dies weist auf eine korrekte Versuchsdurchführung hin, da die Kontrollen mit MgSO₄ anstelle von Zellen des Wirtsstammes 3107 pipettiert wurden und somit keine Zellen zur Adsorption vorhanden sind.

Die Versuche „mit Zellen“, im Folgenden mit „Zellen ir“ und „Zellen re“ gekennzeichnet, zeigen bei allen Versuchen einen monoton fallenden Kurvenverlauf. Bei den Phagen P1164, P1165 und P1169 ist zu sehen, dass der Phagentiter zwischen 1 und 5 min. um eine Zehnerpotenz gesunken ist. Der Phage P1173 weist eine derartige Titerreduktion bereits nach 1 min. auf. Außerdem wird deutlich, dass die Phagentiter stets flacher abfallen und sich so einem unteren Grenzwert nähern. Dieser Grenzwert liegt bei einer Adsorptionsrate von 100 %, das heißt alle Phagen sind an eine Zelle adsorbiert und es können keine freien Phagen mehr nachgewiesen werden. Es ist hervorzuheben, dass bei der irreversiblen Adsorption des Phagen P1169 ein Anstieg nach 10 min. des Titers zu erkennen ist.

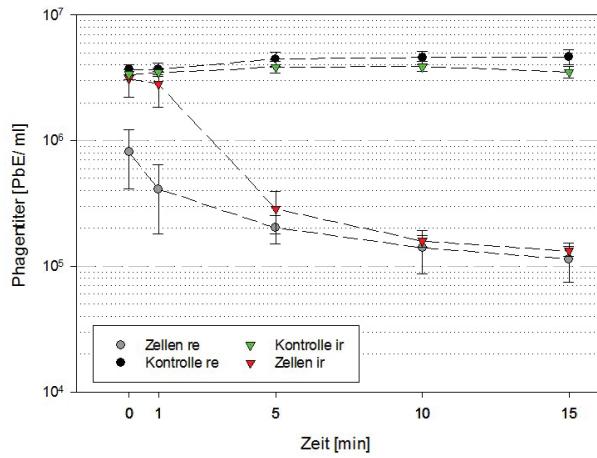


Abbildung 16: Adsorptionsverlauf des Phagen P1164 bei 30°C bei einer MOI von 0,1/ Versuchsdauer 0 - 15 min., 3-fach-Bestimmung, reversible (re) und irreversible (ir) Adsorption mit Zellen des Wirtsstamm 3107 und Kontrolle ohne Wirtsstamm mit MgSO₄.

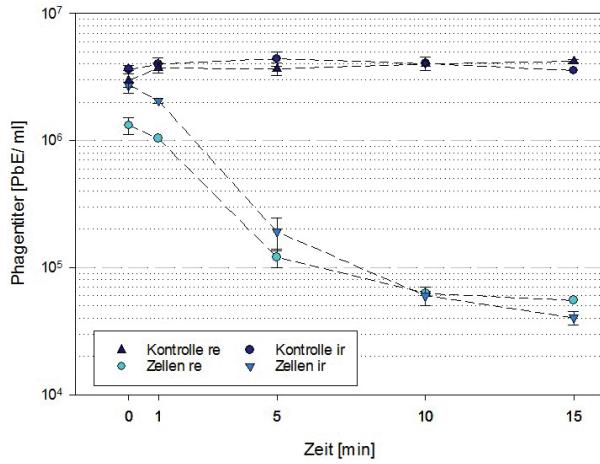


Abbildung 17: Adsorptionsverlauf des Phagen P1165 bei 30°C bei einer MOI von 0,1/ Versuchsdauer 0 - 15 min., 2-fach-Bestimmung, reversible (re) und irreversible (ir) Adsorption mit Zellen des Wirtsstamm 3107 und Kontrolle ohne Wirtsstamm mit MgSO₄.

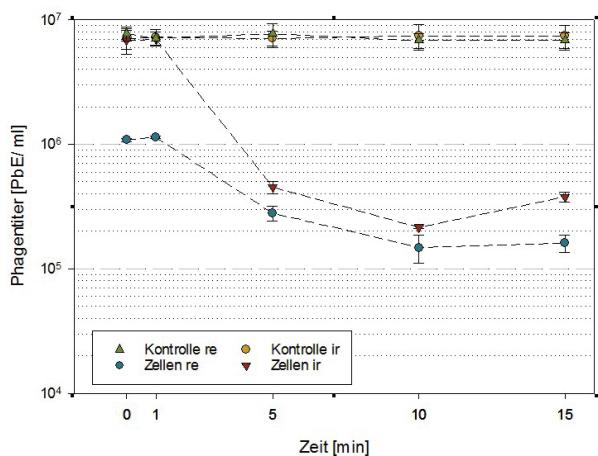


Abbildung 18: Adsorptionsverlauf des Phagen P1169 bei 30°C bei einer MOI von 0,1/ Versuchsdauer 0 - 15 min., 2-fach-Bestimmung, reversible (re) und irreversible (ir) Adsorption mit Zellen des Wirtsstamm 3107 und Kontrolle ohne Wirtsstamm mit MgSO₄.

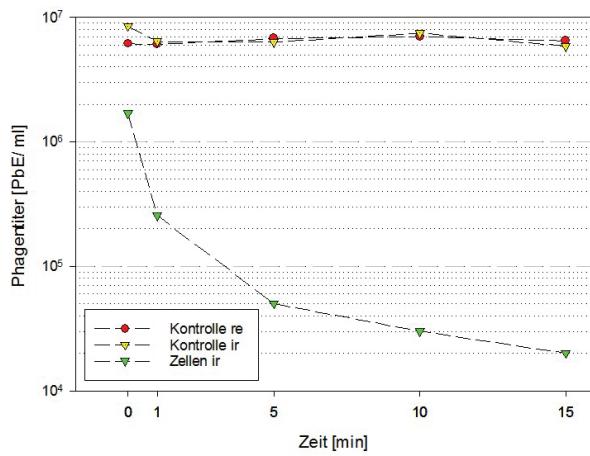


Abbildung 19: Adsorptionsverlauf des Phagen P1173 bei 30°C bei einer MOI von 0,1/ Versuchsdauer 0 - 15 min., 1-fach-Bestimmung, reversible (re) und irreversible (ir) Adsorption mit Zellen des Wirtsstamm 3107 und Kontrolle ohne Wirtsstamm mit MgSO₄.

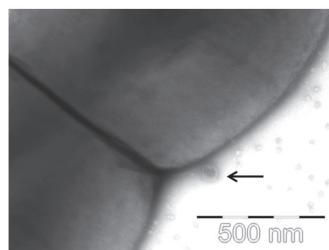


Abbildung 20: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des Rohmilchphagen P1164 (s. Pfeile) nach Adsorption an *L.lactis* 3107 Wirtszellen (Negativkontrastierung mit 2 % (w/v) Uranylacetat), Aufnahmen bei 65.000-facher Primärvergrößerung.

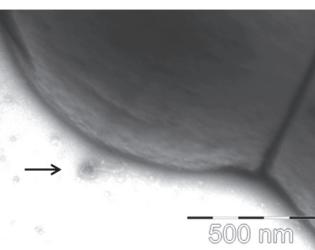


Abbildung 21: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des Rohmilchphagen P1165 (s. Pfeile) nach Adsorption an *L.lactis* 3107 Wirtszellen (Negativkontrastierung mit 2 % (w/v) Uranylacetat), Aufnahmen bei 65.000-facher Primärvergrößerung.

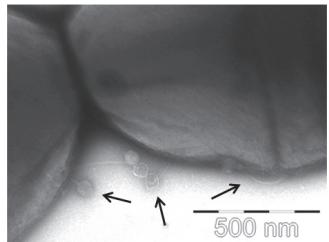


Abbildung 22: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des Rohmilchphagen P1169 (s. Pfeile) nach Adsorption an *L.lactis* 3107 Wirtszellen (Negativkontrastierung mit 2 % (w/v) Uranylacetat), Aufnahmen bei 65.000-facher Primärvergrößerung.

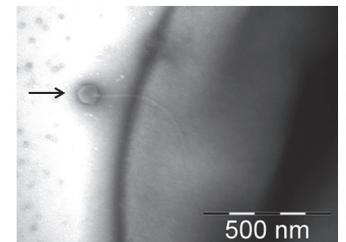
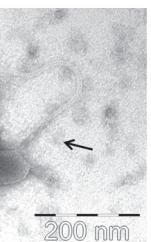


Abbildung 23: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des Rohmilchphagen P1173 (s. Pfeile) nach Adsorption an *L.lactis* 3107 Wirtszellen (Negativkontrastierung mit 2 % (w/v) Uranylacetat), Aufnahmen bei 65.000-facher Primärvergrößerung.



5.3.5 One Step Growth-Versuche

Die folgende Tabelle 15 zeigt zusammengefasst die Latenzzeiten und die Wurfgrößen der vier Phagen P1164, P1165, P1169 und P1173. Es ist zu erkennen, dass drei Phagen die gleiche Latenzzeit aufweisen und der Phage P1169 sich mit 40 min. von diesen drei abhebt.

Die größte Replikationsrate von 6,3 Phagen pro Zelle weist der Phage P1173 auf.

Tabelle 15: Übersicht der Latenzzeiten und Wurfgrößen der Phagen P1164, P1165, P1169 und P1173, ermittelt durch One Step Growth-Versuche

Phage	Latenzzeit	Wurfgröße
P1164	30 min.	4,9 Phagen pro Zelle
P1165	30 min.	5,4 Phagen pro Zelle
P1169	40 min.	3,0 Phagen pro Zelle
P1173	30 min.	6,3 Phagen pro Zelle

Die folgenden Abbildung 24 bis Abbildung 27 zeigen grafisch die One Step Growth Kurvenverläufe. Es wird der Phagentiter in PbE/ml in Abhängigkeit der Zeit in min. dargestellt. Bei allen Diagrammen ist ein exponentieller Anstieg des Titers nach der Latenzzeit zu erkennen. Vor und nach diesem Anstieg sind die Kurvenverläufe annähernd konstant. Dies bedeutet, dass während dieser Zeit die Phagen an die Zelle adsorbieren und sich in der Zelle vermehren.

Bei den Phagen P1165 und P1173 wurde jeweils über 70 min. und bei den Phagen P1164 und P1169 wurde bis 60 min. gemessen. Danach ist eine Plateaubildung zu erkennen was auf einen Abschluss eines Zyklus des Replikationsvorganges deutet. Die „phage added“ Linie dient als Referenz zur Berechnung der Wurfgröße.

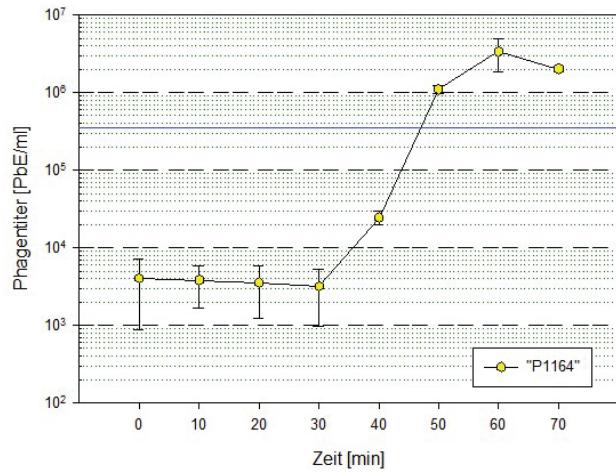


Abbildung 24: One Step Growth des Phagen P1164 bei 30°C bei einer MOI von 0,005 mit dem Wirtsstamm 3107, Die zugegebenen Phagen sind durch die blaue Referenzlinie dargestellt / Versuchsdauer 0- 70 min., 2-fach-Bestimmung.

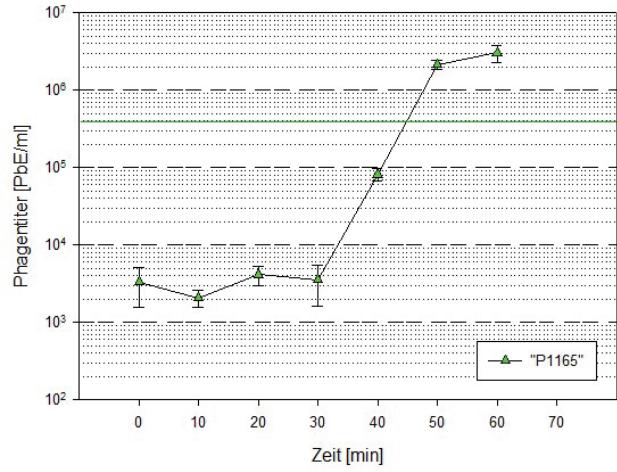


Abbildung 25: One Step Growth des Phagen P1165 bei 30°C bei einer MOI von 0,005 mit dem Wirtsstamm 310, Die zugegebenen Phagen sind durch die grüne Referenzlinie dargestellt, Versuchsdauer 0- 60 min., 2-fach-Bestimmung.

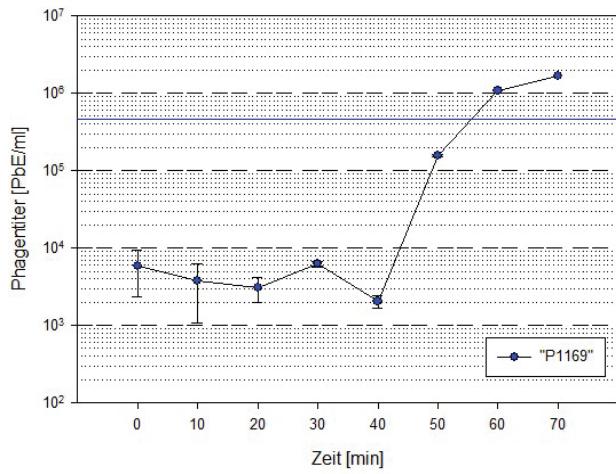


Abbildung 26: One Step Growth des Phagen P1169 bei 30°C bei einer MOI von 0,005 mit dem Wirtsstamm 3107. Die zugegebenen Phagen sind durch die blaue Referenzlinie dargestellt, Versuchsdauer 0- 70 min., 2-fach-Bestimmung.

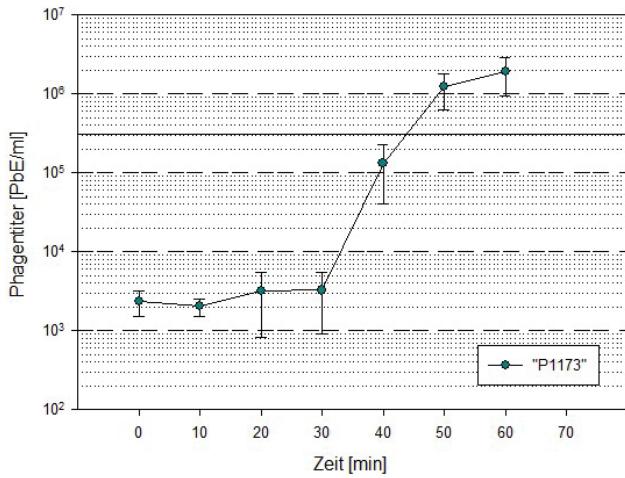


Abbildung 27: One Step Growth des Phagen P1173 bei 30°C bei einer MOI von 0,005 mit dem Wirtsstamm 3107. Die zugegebenen Phagen sind durch die graue Referenzlinie dargestellt, Versuchsdauer 0- 60 min., 3-fach-Bestimmung.

5.3.6 Lytische Anzucht

Die grafische Darstellung der lytischen Anzucht der Phagen P1164, P1165, P1169 und P1173 sind in den folgenden Abbildung 28 bis Abbildung 31 gezeigt. Es wird die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 620 nm in Abhängigkeit der Zeit in min. dargestellt. Anhand der optischen Dichte kann in Korrelation das Wachstum der Bakterienstämme aufgezeigt werden. Die Messungen wurden bis zu dem Zeitpunkt $t = 24$ h durchgeführt. Alle Kontrollen weisen den typischen exponentiellen Wachstumsverlauf einer Bakterienkultur auf. In allen Diagrammen ist ein Abfall der optischen Dichte des phageninfizierten Wirtsstammes zu verzeichnen. Bei den Phagen P1164, P1165 und P1169 ist jedoch ein Wiederanstieg der optischen Dichte zu erkennen. Bei den Phagen P1164 und P1165 zeigt der Kurvenverlauf einen Abfall der optischen Dichte bei circa 3 h und eine anschließende Zunahme, die gegen das Maximum der Kontrolle strebt. Bei dem Phagen P1173 wird das Wachstum des Wirtsstammes ebenfalls erst nach circa 2 h unterdrückt. Es ist jedoch zu erkennen, dass dieser Phage das Wachstum komplett inhibiert. Bei dem Phagen P1169 zeigt die Verlaufskurve einen Anstieg nach 6,5 h. Vorher wird das Wachstum des Wirtsstammes durch diesen Phagen komplett unterdrückt.

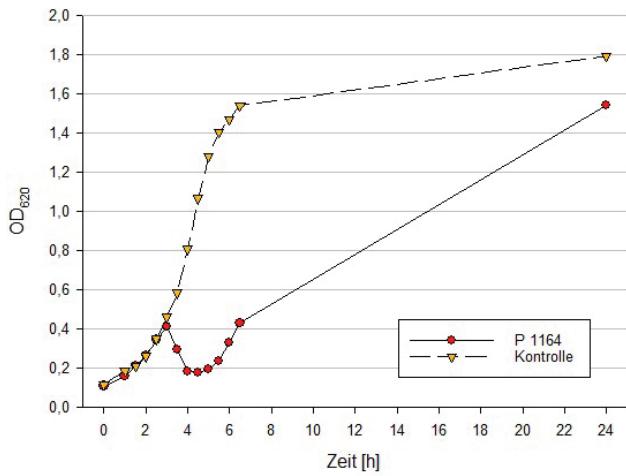


Abbildung 28: Lytische Anzucht des Phagen P1164 bei 30°C bei einer MOI von 0,01, Wirtsstamm 3107 durch Phagen infiziert (P1164) und nicht infiziert (Kontrolle), 1-fach-Bestimmung.

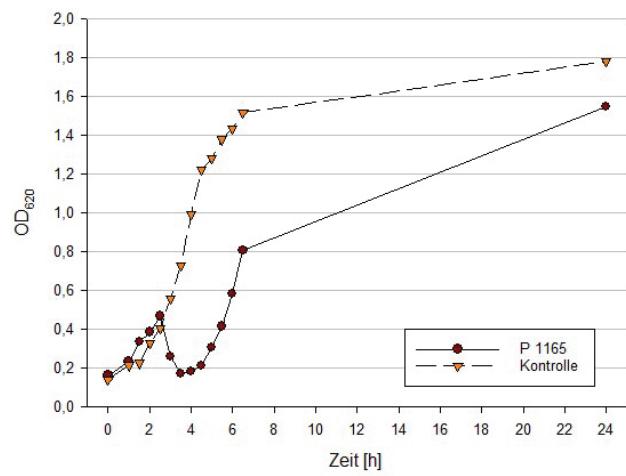


Abbildung 29: Lytische Anzucht des Phagen P1165 bei 30°C von 0,01, Wirtsstamm 3107 durch Phagen infiziert (P1165) und nicht infiziert (Kontrolle), 1-fach-Bestimmung.

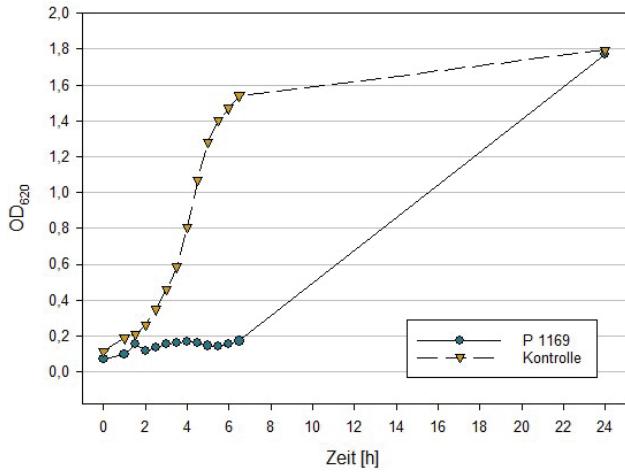


Abbildung 30: Lytische Anzucht des Phagen P1169 bei 30°C bei einer MOI von 0,01, Wirtsstamm 3107 durch Phagen infiziert (P1169) und nicht infiziert (Kontrolle), 1-fach-Bestimmung.

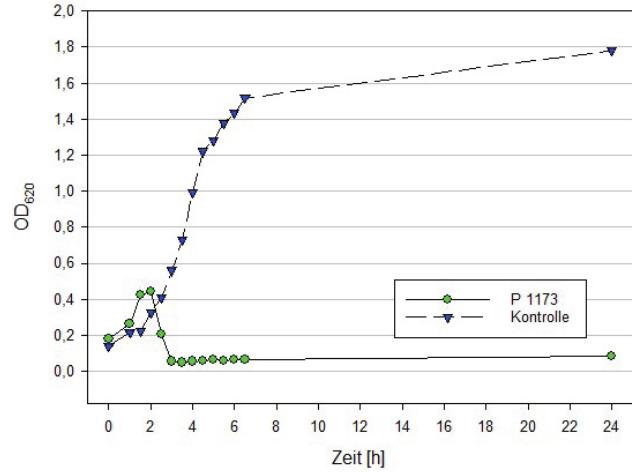


Abbildung 31: Lytische Anzucht des Phagen P1173 bei 30°C von 0,01, Wirtsstamm 3107 durch Phagen infiziert (P1173) und nicht infiziert (Kontrolle), 1-fach-Bestimmung.

6 Auswertung und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 27 Rohmilchproben von verschiedenen Molkereien aus Deutschland auf Phagen untersucht. Die von Meersteiner (2017) analysierten Rohmilchproben wiesen eine Phagenkontamination von circa 40 % auf. Dieses Ergebnis kann durch die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da in keiner der untersuchten Rohmilchproben Phagen gefunden wurden. Es können zwar Phagen in den Proben vorhanden sein, diese konnten aber mit den eingesetzten Kulturen nicht detektiert werden. Daher ist die publizierte Aussage, dass Rohmilch als Haupteintragsquelle von Phagen in Molkereien gilt, zu hinterfragen (Madera, et al., 2004). Die hohe Diversität der Phagen in den Rohmilchproben sollte deshalb Inhalt weiterführender Untersuchungen sein.

Außerdem wurden in dieser Arbeit vier aus der Rohmilch isolierte Phagen genauer Charakterisiert. Es handelt sich dabei um die *L. lactis* Phagen P1164, P1165, P1169 und P1173. Aufgrund ihrer morphologisch charakteristischen Merkmale, die durch die Analyse mittels TEM bestimmt wurden, können die Phagen zwei Gruppen zugeordnet werden. Die Phagen P1164, P1165 und P1169 sind morphologisch, aufgrund des isodiametrischen Kopfes, der Schwanzlänge von circa 230- 240 nm und dem zu erkennenden Fiber in die Gruppe P335-Untergruppe BK5-T (Untergruppe I) eingegliedern (Jarvis, 1984). Anzumerken ist, dass der Phage P1164 mit einer Schwanzlänge von circa 260 nm etwas von den Merkmalen dieser Gruppe abweicht. Die Genomvergleiche zeigen jedoch keine Übereinstimmungen mit der Gruppe BK5-T (Untergruppe I). Dies lässt vermuten, dass diese Phagen eine eigene noch nicht bestimmte Gruppe bilden. Eine Besonderheit konnte bei dem Phagen P1165 festgestellt werden. Dieser Phage weist ein Hybridgenom auf, welches sowohl *L. lactis* als auch *S. thermophilus* Sequenzen fasst.

Der Phage P1173 weist einen deutlich längeren Schwanz mit circa 506 nm auf. Daher kann dieser Phage anhand der bisher publizierten Schwanzlängen der Gruppe der 949 Phagen zugeordnet werden (Deveau, et al., 2006). Der Genomvergleich zeigt, dass das Genom des P1173 mit dem des 949 Phage zu 81 % übereinstimmt und demzufolge auch dieser Gruppe zuzuordnen ist.

Die darauf folgenden Versuche zur Ermittlung der Phagensensitivität verschiedener Starterkulturen mittels MTP-Test zeigten keine positiven Ergebnisse. Daraus folgt, dass die in dieser Arbeit untersuchten Phagen nicht zu den Phagen gehören die sonst üblicherweise in den Molkereien Probleme mit Starterkulturen verursachen. Häufig werden hier die Phagen der Gruppe P335 als Problemphagen genannt (Kelly, et al., 2013). Jedoch scheint das für die Untergruppe BK5-T (Untergruppe I) nicht zuzutreffen. Außerdem wurden *S. thermophilus* Stämme auf die Sensitivität des Phagen P1165 überprüft und obwohl im Genom Sequenzen des

S. thermophilus Phagen vorliegen, konnte keine Adsorptionsaffinität aufgezeigt werden. Es könnte sein, dass der vorliegende Genomabschnitt zu den Morphogenesemodulen und nicht zu den Replikationsmodulen gehört (McDonnell, et al., 2016).

Des Weiteren wurde für eine umfassendere Beschreibung auf mikrobiologischer Ebene der Phagen die Plaquebildung dokumentiert. Dabei zeigten die drei Phagen des Types BK5-T (Untergruppe I) klar vom Bakterienrasen abgegrenzte kleine Plaques. Der Phage aus der Gruppe der 949 Phagen wies hingegen eine Anomalie zu den anderen Phagen auf. Er bildet um den eigentlichen Plaque einen Lysehof, einen Halo. Dieser Halo entsteht durch aktive Phagenlysine, welche die EPS der Bakterienkultur auflösen. Diese Enzyme haben aber laut Deveau (2002) keinen Einfluss auf die Adsorptionszeit bzw. auf die Replikationsrate der Phagen. Diese Aussage kann durch die in dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen nur teilweise bestätigt werden. Der Phage P1173 zeigt nach 1 min. eine irreversible Adsorptionsrate von 96 %, was im Vergleich zu den anderen untersuchten Phagen ein hoher Wert ist. Die Adsorptionszeiten für eine mindesten 96 %-ige irreversible Adsorptionsrate beträgt bei den anderen Phagen P1165 10 min. und bei den Phagen P1164 und P1169 15 min. Aus anderen Publikationen stammende Werte für *L. lactis* Phagen zeigen irreversible Adsorptionsraten von 92,9 % bei 10 min. (Breum, et al., 2007). Es kann also ein Zusammenhang zwischen den Enzymen und der hohen irreversiblen Adsorptionsrate des Phagen P1173 vermutet werden.

Hohe Adsorptionsraten führen laut Shao (2008) zu einer schnelleren Latenzzeit. Der Phage P1173 weist zwar eine hohe Adsorptionsrate auf, die Latenzzeit liegt jedoch verglichen mit den Phagen in dieser Arbeit im Durchschnitt bei 50 min. Werden andere Phagen aus der Gruppe 949 betrachtet, welche durchschnittliche Latenzzeiten von 71 min. aufweisen, so ist zu erkennen, dass die Latenzzeit des Phagen P1173 hier über dem Schnitt liegt (Samson & Moineau, 2010; Moineau, et al., 1993).

Die Aussage, dass sich die Phagenlysine nicht auf die Replikationsrate auswirken, kann bestätigt werden, da der Phage P1173 mit einer Wurfgröße von 6,3 Phagen pro infizierter Zelle eine nicht signifikant höhere Wurfgröße aufweist als die Phagen der Gruppe BK5-T (Untergruppe I).

Diese weisen Wurfgrößen von P1164 = 4,9, P1165 = 5,4 und P1169 = 3,0 Phagen pro infizierter Zelle auf. Die Wurfgröße des vergleichbaren Phagen 949 ist mit 78 Phagen pro infizierter Zelle signifikant höher (Samson & Moineau, 2010).

Die von Fernandez (2017) besagten Fermentationsstörungen ausgelöst durch Phagen, können anhand der vorliegenden Daten über die Phagen P1164, P1164, P1169 und P1173 nicht bestätigt werden. Durch die geringen Wurfgrößen können sich die Phagen nicht schnell genug Vermehren, um eine stabile Phagenpopulation in Molkereien aufzubauen. Außerdem zeigt das

Lytischeverhalten der Phagen, dass die Phagen der BK5-T Gruppe (Untergruppe I) das Wachstum des *L. lactis* Wirtsstammes zwar zweitweise hemmen, es aber nicht komplett inhibieren können. Der Phage P1173 inhibiert zwar den Wirtsstamm, jedoch treten Phagen der P949 Gruppe in Molkereien eher selten auf (Mahony, et al., 2015). Zudem zeigten die Phagen keine Sensitivität gegenüber den getesteten Starterkulturen auf. Zusätzlich kommt die von Meersteiner (2017) ermittelte limitierende Thermostabilität der P335 Phagen von 65°C, sodass die Phagen bei einer Pasteurisation der Rohmilch inaktiviert werden. Dies gilt auch für die Phagen der 949 Gruppe, hier wurden Inaktivierungstemperaturen von 63°C bis 83°C dokumentiert (Mahony, et al., 2017).

Daher kann abschließend gesagt werden, dass die Rohmilchphagen, die in dieser Arbeit untersuchten worden sind, keine signifikante Bedeutung für Starterkulturen in Molkereien aufweisen.

7 Zusammenfassung

Es wurden in dieser Arbeit, aufbauend auf Ergebnisse von Meersteiner (2017), 27 Rohmilchproben aus verschiedenen Molkereien auf Phagen untersucht. Divergierend zu den Proben aus der vorangehenden Arbeit konnten in dieser Arbeit keine Phagen in Rohmilch nachgewiesen werden. Außerdem wurden vier Phagen für eine genauere Charakterisierung ausgewählt. Die Phagen der P335 Untergruppe BK5-T (Untergruppe I) P1164, P1165, P1169 und P1173 der Phagengruppe 949 konnten in einer früheren Arbeit aus Rohmilchproben isoliert werden. Diese Einteilung ist durch Aufnahmen eines Transmissionselektronenmikroskops verifiziert worden. Durch einen Genomvergleich mit den nächsten verwandten Phagen wurde für den Phagen P1165 gezeigt, dass er ein Hybridgenom aus *L. lactis* und *S. thermophilus* Phagengenomregionen enthält. Um ein besseres mikrobiologisches Gesamtbild der Phagen zu erhalten, wurden die Phagen auf Adsorptionszeit und -raten, sowie Wurfgröße, Latenzzeit und Lytischesverhalten gegenüber *L. lactis* Stämmen untersucht. Hierbei wies der Phage P1173 die größte Wurfgröße von 6,3 freigesetzten Phagen pro infizierte Zelle auf. Ferner konnte bei diesem Phagen eine schnelle irreversible Adsorption nachgewiesen werden. Dieser Phage ist der einzige der den Wirtsstamm 3107 komplett inhibieren konnte. Zusätzlich ist eine Anomalie gegenüber den anderen Phagen bei der Plaquebildung zu verzeichnen. Der Phage bildet Halos, die durch aktive Phagenlysin verursacht werden.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde die Bedeutung der aus Rohmilch isolierten Phagen gegenüber Starterkulturen in Molkereien diskutiert. Es kann gesagt werden, dass unter anderem aufgrund der geringen Wurfgröße die untersuchten Rohmilchphagen keine signifikante Relevanz für Starterkulturen aufweisen. Zudem konnte in dieser Arbeit keine weiteren Wirtsstämmen für diese Phagen identifiziert werden.

8 Literaturverzeichnis

- Ackermann, H., 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, Volume 153, pp. 227-243.
- Ackermann, H. & Eisenstark, A., 1974. The present state of phage taxonomy. *Intervirology*, Volume 3, pp. 201-219.
- Altschul, S. Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, Volume 25, p. 3389–3402.
- Ammann, A., Neve, A., Geis, A. & Heller, K., 2008. Plasmid transfer via transduction from *Streptococcus thermophilus* to *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, Volume 190, pp. 3083-3087.
- Bockelmann, W., Willems, K., Neve, H. & Heller, K., 2005. Cultures for ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal*, Volume 15, pp. 719-732.
- Bogosian, G., 2006. Control of bacteriophage in commercial microbiology and fermentation facilities. In: *The Bacteriophages*. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, pp. 667-672.
- Breum, S., Neve, H., Heller, K. & Vogensen, F., 2007. Temperate phages TP901-1 and LC3, belonging to the P335 species, apparently use different pathways for DNA injectionin *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 3107. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 2, pp. 156-164.
- Bünnige, M., 2014. Heilende Killer- Comeback der Bakteriophagen. *German Centre for Infection Research*, pp. 1-7.
- Campbell, N., 2015. *Campbell Biologie*. 10 ed. Heidelberg: Pearson.
- Casey, E., Mahony, J., Neve, H., Noben, J.P., Bello, F.D., van Sinderen, D., 2015. Novel phage group infecting *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*,as revealed by genomic and proteomic analysis of bacteriophage Ld11. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 81, pp. 1319-1326.
- Cavanagh, D., Guinane, C.M., Neve, H., Coffey, A., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., McAuliffe, O., 2014. Phages of non-dairy lactococci: isolation and characterization of phiL47, a phage infecting the grass isolate *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* DPC6860. *Frontiers in Microbiology*, Volume 4, p. 417.

- Chapot- Chartier, M.- P., Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Adre, G., Mistou, M.Y., Trieu-Cuot, P., Furlan, S., Bidnenko, E., Courtin, P., Péchoux, C., Hols, P., Dufrene, Y.F., Kulakauskas, S., 2010. Cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharid pellicle. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 285, pp. 10464-10471.
- Deveau, H., Labrie, S., Chopin, M. & Moineau, S., 2006. Biodiversity and classification of Lactococcal phages. *Applied and Environmental*, Volume 72, pp. 4338-4346.
- Deveau, H., Van Calsteren, M. & Moineau, S., 2003. Effect of exopolysaccharides on phage-host interactions in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 69, p. 723.
- Dietrich, J., 2008. *Thermische Inaktivierung von Bakteriophagen der mesophilen und thermophilen Milchsäurebakterien*, Kiel: Max Rubner Institut- Mikrobiologie und Biotechnologie.
- Eisenbrand, G., 2010. *Mikrobielle Kulturen für Lebensmittel*, Kaiserslautern: DFG Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln.
- Fernández, L., Escobedo, L., Gutiérrez, D. Portilla, S., García, P., Rodrigues, A., 2017. Bacteriophages in the dairy environment: from enemies to allies. *Antibiotics*, Volume 6, p. 27.
- Heller, K., Loessner, M. & Fiesler, L., 2011. *Bakteriophagen- Grundlagen, Rolle in Lebensmitteln und Anwendung zum Nachweis sowie der Kontrolle von Krankheitserregern*. Hamburg: Behr's Verlag.
- Heller, K. & Neve, H., 2016. Starter- und Reifungskulturen. In: E. Märtybauer & H. Becker, eds. *Milchkunde und Milchhygiene*. Stuttgart: Eugen Ulmer KG, pp. 321-338.
- Hughes, K., Sutherland, I., Sutherland, I.W., Clark, J., Jones, M.W., 1998. Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases – novel tools for study of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 86, pp. 583-590.
- Jarvis, A., 1984. Differentiation of lactic streptococcal phages into phage species by DNA-DNA homology. *Applied Environmental Microbiology*, Volume 47, pp. 1031-1038.
- Josephsen, J. & Neve, H., 2004. Bacteriophage and antiphage mechanisms of lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects*. 3 ed. New York: Marcel Dekker AG, pp. 295-350.

- Kelleher, P., Bottacini, F., Mahony, J., Kilcawley, N., van Sinderen D., 2017. Comparative and functional genomics of the *Lactococcus lactis* taxon; insights into evolution and niche adaptation. *BMC Genomics*, Volume 18, p. 267.
- Kelly, W., Altermann, E., Lambie, S. & Leahy, S., 2013. Interaction between the genomes of *Lactococcus lactis* and phages of the P335 species. *Frontiers in Microbiology*, Volume 4, p. 257.
- Krämer, J., 2007. *Lebensmittel- Mikrobiologie*, Stuttgart: Ulmer.
- Labrie, S., Josephsen, J., Neve, H., Vogensen, F.K., Moineau, S., 2008. Morphology, genome sequence, and structural proteome of type phage P335 from *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology*, Volume 74, pp. 4636-4644.
- Labrie, S. & Moineau, S., 2002. Demonstration of phage heterogeneity within the P335 quasi-species of lactococcal phages. *Virology*, Volume 296, pp. 308-320.
- M.B., 2018. *Spektrum.de*. [Online]
Available at: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/homologe-rekombination/32436>
[Accessed 04 05 2018].
- Madera, C., Monjardin, C. & Suárez, J., 2004. Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fat of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 70, pp. 7365-7371.
- Mahony, J., Moscarelli, A., Kelleher, P., Lugli, G.A. Ventura, M., Settanni, L., van Sinderen, D., 2017. Phage biodiversity in artisanal cheese wheys reflects the complexity of the fermentation process. *Viruses*, Volume 9, p. 45.
- Mahony, J., Randozzo, W., Neve, H., Settanni, L., van Sinderen, D., 2015. Lactococcal 949 group phages recognize a carbohydrate receptor on the host cell surface. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 81, pp. 3299-3305.
- Mahony, J., Murphy 2013. Investigation of the relationship between lactococcal host cell wall polysaccharide genotype and 936 phage receptor binding protein phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 79, pp. 4385-4392.
- Makarova, K., Slesareva, A., Wolf, A., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, Volume 103, pp. 15611-15616.

McDonnell, B., Mahony, J. & Neve, H., 2016. Identification and analysis of a novel group of bacteriophages infecting the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 82, pp. 5153-5165.

Meersteiner, J., 2017. Nachweis und Charakterisierung von Bakteriophagen der Milchsäurebakterien in Rohmilchproben von Milchbetrieben, Kiel: Max Rubner Institut- Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie.

Mills, S., Ross, R., Neve, H. & Coffey, A., 2011. Bacteriophage and anti-phage mechanisms in lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria*. London: CRC Press, pp. 165-186.

Moineau, S., Pandian, S. & Klaenhammer, T., 1993. Restriction/ modification systems and restriction endonucleases are more effective on lactococcal bacteriophages that have emerged recently in the dairy industry. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 59, pp. 197-202.

Muhammed, K. & Vogensen, F., 2018. *L. lactis Prophagengenom*, Copenhagen: s.n.

Neve, H., Berger, A. & Heller, K., 1995. A method for detecting and enumerating airborne virulent bacteriophage of dairy starter cultures. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, Volume 47, pp. 193-207.

Oliveira, J., Mahony, J. & Lugli, G., 2016. Genome sequences of eight prophages isolated from *Lactococcus lactis* dairy strains. *Genome Announcements*, Volume 4.

Rohde, C. & Sikorski, J., 2011. Bakteriophagen- Vielfalt, Anwendung und ihre Bedeutung für die Wissenschaft vom Leben. *Naturwissenschaftliche Rundschau*.

Rousseau, G. & Moineau, S., 2009. Evolution of *Lactococcus lactis* phages within a cheese factory. *Applied and environmental microbiology*, Volume 75, pp. 5336-5344.

Salmond, G. & Fineran, P., 2015. A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews*, Volume 13, pp. 77-786.

Samson, J. & Moineau, S., 2010. Characterization of *Lactococcus lactis* phage 949 and comparison with other lactococcal phages. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 76, pp. 6843-6852.

Shao, Y. & Wang, I., 2008. Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. *Genetics*, Volume 180, pp. 471-482.

- Spinelli, S., Veesler, D., Bebeacua, C. & Cambillau, C., 2014. Structures and host-adhesion mechanisms of lactococcal siphophages, s.l.: *Frontiers in Microbiology*.
- Szymczak, P., Janzen, T. & Neves, A., 2016. Novel variants of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages indicate genetic recombination across phages from different bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 84.
- Terzaghi, B. & Sandine, W., 1981. Bacteriophage production following exposure of lactic streptococci to ultraviolet radiation. *Journal of General Microbiology*, Volume 122, pp. 305-311.
- Wang, I.-N., 2006. Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics*, Volume 172, pp. 17-26.
- Wittman, J., 2018. *Leibniz- Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*. [Online]
Available at: <https://www.dsmz.de/de/start/aktuelles/phagen-infosseite/was-sind-bakteriophagen.html>
[Accessed 03 05 2018].

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mehrstammkulturen für die Käseherstellung (Heller & Neve, 2016).....	3
Tabelle 2: Verwendete Geräte.....	10
Tabelle 3: Verwendete Nährmedien.....	11
Tabelle 4: Verwendete Lösungen.....	12
Tabelle 5: Verwendete Bakterienstämme	13
Tabelle 6: Verwendete Phagenisolate	14
Tabelle 7: sonstige verwendete Materialien.....	14
Tabelle 8: Screening von Starterkulturen auf Phagensensitivität mittels Mikrotiterplattentest....	18
Tabelle 9: Zusammensetzung des Phagenansatzes P1165 für Adsorptionsversuche.....	20
Tabelle 10: Abmessungen der morphologischen Merkmale P1164 und P1165	25
Tabelle 11: Abmessungen der morphologischen Merkmale P1169 und P1173	26
Tabelle 12: Ergebnisse der BLASTN-Analyse P1164 und P1165.....	28
Tabelle 13: Ergebnisse der BLASTN-Analyse P1169 und P1173.....	29
Tabelle 14: reversible und irreversible Adsorptionsraten P1164, P1165, P1169, P1173.	32
Tabelle 15: Übersicht der Latenzzeiten und Wurfgrößen P1164, P1165, P1169, P1173	36
Tabelle 16: Verwendete Chemikalien	53
Tabelle 17: One step Growth, Phagenansatz von P1164, P1165, P1169 und P1173.....	54
Tabelle 18: Lytische Anzucht, Phagentiter der Phagen P1164, P1165, P1169 und P1173.	54
Tabelle 19: Adsorptionsversuch, Phagenansatz von P1164, P1165, P1169 und P1173.....	54

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der Bakteriophagen nach Morphotypen	4
Abbildung 2: Charakteristische Morphologie eines <i>Myoviridae</i> -Bakteriophagen.....	5
Abbildung 3: spezifischer Adsorptionsmechanismus eines p2 Phagen	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Reproduktionszyklen von Bakteriophagen.	8
Abbildung 5: Klassifizierung der <i>L. lactis</i> Phagen.	9
Abbildung 6: Mikrotiterplatten mit <i>Lactococcus lactis</i>	23
Abbildung 7: TEM- Aufnahme des Phagen P1164.....	24
Abbildung 8: TEM- Aufnahme des Phagen P1165.....	24
Abbildung 9: TEM- Aufnahme des Phagen P1169.....	25
Abbildung 10: TEM- Aufnahme des Phagen P1173.....	25
Abbildung 11: Genomvergleich der Phagen P1164, P1165, P1169 sowie P1173	27
Abbildung 12: klare Plaques des Phagen P1164.....	30
Abbildung 13: klare Plaques des Phagen P1165	30
Abbildung 14: kleine, klare Plaques des Phagen P1169	31
Abbildung 15: große, in der Mitte klare Plaques des Phagen P1173	31
Abbildung 16: Adsorptionsverlauf des Phagen P1164	33
Abbildung 17: Adsorptionsverlauf des Phagen P1165	33
Abbildung 18: Adsorptionsverlauf des Phagen P1169	34
Abbildung 19: Adsorptionsverlauf des Phagen P1173	34
Abbildung 20: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme P1164	35
Abbildung 21: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme P1165.	35
Abbildung 22: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme P1169	35
Abbildung 23: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme P1169	35
Abbildung 24: One Step Growth des Phagen P1164	37
Abbildung 25: One Step Growth des Phagen P1165	37
Abbildung 26: One Step Growth des Phagen P1169	38
Abbildung 27: One Step Growth des Phagen P1173	38
Abbildung 28: Lytische Anzucht des Phagen P1164	40
Abbildung 29: Lytische Anzucht des Phagen P1165	40
Abbildung 30: Lytische Anzucht des Phagen P1169.....	41
Abbildung 31: Lytische Anzucht des Phagen P1173	41

11 Formelverzeichnis

Phagentiter Bestimmung	16
Adsorptionsbestimmung	20
Burstsizebestimmung	21
MOI Bestimmung.....	22

12 Anhang

Tabelle 16: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agar-Agar (hochrein)	Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure	AppliChem
Bacto-Agar	Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich
Beef-Extract	BD, Becton Dickinson, Sparks, USA
Bromkresolpurpur	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl2)	Merck, Darmstadt
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Ellikerboullion	BD, Becton Dickinson, Sparks, USA
Ethanol unvergällt	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
Lackmuslösung	Fluka Analytical
Lactose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natrium-β-Glycerophosphat	VWR, Leuve, Belgien
Phytone-Peptone	BD, Becton Dickinson, Sparks, USA
Poly-Peptone	BD, Becton Dickinson, Sparks, USA
Ringer-Tabletten	Merck, Darmstadt
Uranylacetat-Lösung	Agar Scientific. Stansted, England
Yeast-Extract	BD, Becton Dickinson, Sparks, USA

Tabelle 17: One step Growth, Phagenansatz von P1164, P1165, P1169 und P1173, MOI = 0,005.

Phage	Phagentiter Lysates [PbE/ml]	Keimzahl 3107 [PbE/ml]	Phagenansatz		
			Lysat [μl]	1 mM CaCl ₂ [μl]	LM17 [μl]
P1164	4,0*10 ⁷	5,1*10 ⁷	1106	14	0
P1165	2,35*10 ⁷	5,1*10 ⁷	650	14	336
P1169	2,3*10 ⁷	5,1*10 ⁷	1130	14	0
P1173	2,9*10 ⁸	5,1*10 ⁷	90	14	896,3

Tabelle 18: Lytische Anzucht, Phagentiter der Phagen P1164, P1165, P1169 und P1173.

Phage	Titer [PbE/ml]
P1164	1,9*10 ⁷
P1165	4,8*10 ⁷
P1169	1,1*10 ⁷
P1173	2,3*10 ⁷

Tabelle 19: Adsorptionsversuch, Phagenansatz von P1164, P1165, P1169 und P1173, MOI = 0,1.

Phage	Phagentiter Lysates [PbE/ml]	Keimzahl 3107 [PbE/ml]	Phagenansatz		
			Lysat [μl]	1 M CaCl ₂ [μl]	LM17 [μl]
P1164	1,9*10 ⁷	5,1*10 ⁷	1000	25	775
P1165	2,35*10 ⁷	4,8*10 ⁷	417	25	1358
P1169	1,1*10 ⁸	5,1*10 ⁷	181	25	1594
P1173	2,9*10 ⁸	5,1*10 ⁷	833	25	942

13 Danksagung

Zuerst möchte mich bei meinen Eltern bedanken ohne die diese Arbeit und mein Studium in der Form nicht möglich gewesen wäre. Danach möchte ich mich bei meiner Freundin Ina bedanken, die mir auch in schwierigen Situationen immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Als nächstes bedanke ich mich bei Erik Brinks und Angela Back die durch die Durchführung der Genomsequenzierung und die Erstellung der TEM-Aufnahmen maßgeblich an dieser Arbeit beteiligt waren. Außerdem geht ein großes Dankeschön an Inka Lammertz und Gisela Paasch die mich bei meinen Laborarbeiten tatkräftig unterstützt haben.

Zusätzlich bedanke ich mich bei Nina Schmidtchen und Isabell Brinkmann für die ereignisreichen Stunden im Labor.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Neve und Natalia Wagner für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Mitbewohnern Steffen, Pia und Hendrik für die tolle Zeit in Kiel und für die rücksichtsvolle Art während des Erstellungszeitraumes dieser Arbeit.

14 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Christopher Burk