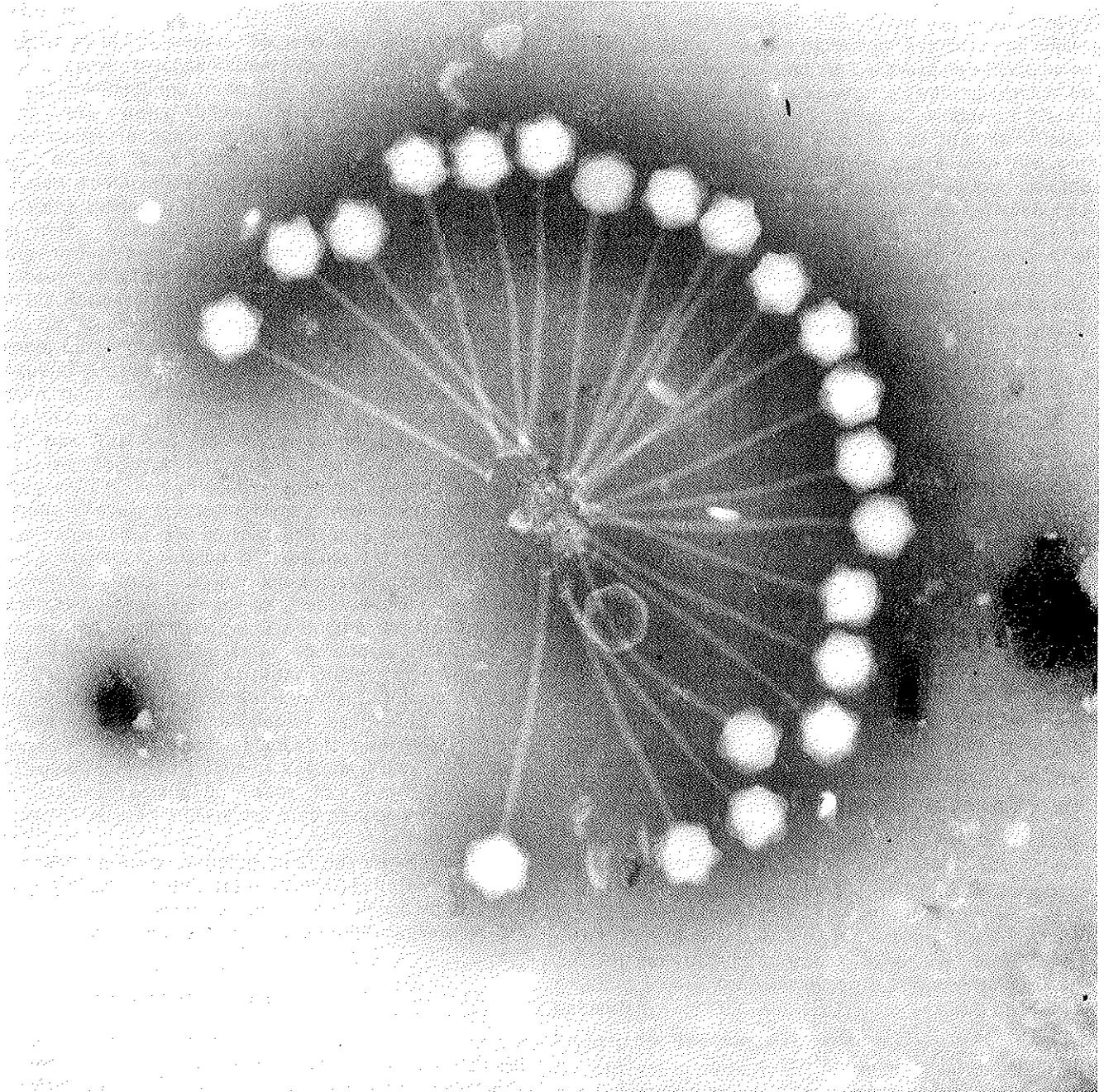


EFAM

INFORMATION

Oktober 1980 / Nr. 101

Herausgegeben von der
Eidgenössischen Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld
Direktor: Prof. Dr. B. Blanc



Bakteriophagen aus *Streptococcus thermophilus*
(Vergrößerung: 175 000 X, Aufnahme M. Rüegg, EFAM)

Bakteriophagenbedingte Säuerungsstörungen in Hartkäsereien

Eingereicht am 29. Oktober 1979

von J. L. Kurmann

Fettsirtenkulturen aus Käsereien und Rohmischkulturen der Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld-Bern, wurden mit Mitomycin behandelt. Die Induktion führte zur Lyse der Laktobazillen und Streptokokken. Aufnahmen von Lysaten im Elektronenmikroskop belegten die Anwesenheit vollausgebildeter Bakteriophagen. Sterilfiltrate aus Käserei-Betriebskulturen und gärungstechnischen Proben enthielten aktive Bakteriophagen. Ihr Nachweis erfolgte indirekt mit Säuerungsaktivitätstesten und Kontrolle im Phasenkontrastmikroskop. Die phagenbedingte Säuerungsstörung wurde anhand dreier Beispiele aus der Käserei-Praxis beschrieben.

1. Einleitung

Der Käser kennt in seinem Betriebe das zuweilen träge Verhalten seiner Milchsäurebakterienkulturen. Bereits bei der Kulturenherstellung oder dann im Käse bilden sie zu langsam und zu wenig Milchsäure oder auch in einer unerwünscht zusammengesetzten Konfiguration (1). Die Abweichungen von der Norm kommen zumeist auch in den Kontrollproben Ausrührsirte und Labgärmolke zum Ausdruck. Wenn keine Fehler in der Milchqualität und in der Fabrikation vorliegen, sowie Änderungen in der Kulturenherstellung und verbesserte Betriebshygiene nicht fruchten, entschliesst sich der Käser zu einem Kulturenwechsel. Bevor die Rohmischkulturen (RMK) der Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft (EFAM) in der Käserei-Praxis allgemein Eingang gefunden hatten, bezog der Käser Fettsirtenkultur aus benachbarten Betrieben. Es zeigte sich indessen, dass nicht eine jede Kultur aus gut fabrizierenden Betrieben mit gleichem Erfolg in einem anderen einsetzbar war. Ihre Aktivität liess zuweilen sofort oder erst nach einigen Tagen wieder nach.

Die Möglichkeit einer phagenbedingten Säuerungsstörung fand lange Zeit wenig Beachtung. Man baute allzu sehr auf die Stammspezifität der Phagen und anvertraute sich der selbstregulierenden, inneren Widerstandskraft der betriebs-eigenen Rohkulturen. Zweifel am selbsttätig ablaufenden Eigenschutz ergaben sich bei der Ueberwachung verschiedenen lang bebrüteter Kulturen. Zu Beginn der Säuerungsstörungen verschwand die eine oder andere Bakterienart oder nahm im Besatz ab. An ihrer Stelle traten vermehrt anormale Zellformen und Zelltrümmer auf. Solche Vorgänge in relativ jungen Kulturen liessen sich kaum mit Autolyse erklären. Der Nachweis plaquebildender Bakteriophagen (Phagen) mit Reinstämmen aus der Kultur auf Zwischichtenagar misslang im Labor. Ihre Anwesenheit bei Säuerungsstörungen musste auf eine andere Weise belegt werden.

Die vorliegende Arbeit berichtet über das Vorkommen temperenter Phagen in den Roh- («Wild»-)kulturen und den labormässig gezüchteten Reinkulturen, sowie über Fälle phagenbedingter Säuerungsstörungen in Hartkäsereien.

2. Material und Methoden

Milchsäurebakterienkulturen:

Wenn der Text nicht anderes erwähnt, handelt es sich um Versandkulturen der Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld-Bern. Die Rohmischkulturen stammen ursprünglich aus verschiedenen Käsereien und sind nicht reingezüchtet. Sie enthalten *Streptococcus thermophilus* (Sc) und *Lactobacillus lactis* oder *helveticus* (Lb), zum Teil auch einige wenige Begleitorganismen. Für die Induktionsversuche mit Mitomycin mussten die RMK in die Haupt-

gruppen Streptokokken und Laktobazillen aufgetrennt werden. Bei der Fettsirtenkultur G, direkt aus einer Greyerz-käserei bezogen, wurden nach dem Ausstrich auf Nähragar (2) 80 Streptokokken- und 90 Laktobazillen-Einzelkolonien auf 10prozentiger rekonstituierter Pulvermagermilch abgeimpft, gemäss ihrer Artzugehörigkeit wieder zu Stammgemischen vereinigt und 20 Stunden bei 38 °C bebrütet. Aus diesen beiden Stammgemischen stellte man die Vorkulturen her. Als Nährmedien für die Vorkulturen und Induktionsversuche dienten bei den Streptokokken Molke + 1 Prozent Caseinpepton Merck und bei den Laktobazillen MRS-Bouillon (3). Die Auftrennung der Streptokokken und Laktobazillen der RMK 101 und 104 erfolgte durch mehrmaliges Kultivieren in Peptonschotte und MRS bei verschiedenen Temperaturen. Die Kulturen erachteten wir als genügend rein, wenn im mikroskopischen Bild keine zweite, morphologisch unterscheidbare Bakterienart mehr beobachtet werden konnte.

Bebrüten im Kurventhermostat

Der Kurventhermostat simuliert die Temperaturen der Hartkäsefabrikation. In unseren Versuchen variierten sie zwischen 32 °C (= Einlabetemperatur) und 56 °C (= Brenntemperatur für Sbrinzkäse).

Nachweis temperenter Phagen:

Die Induktion zur Phagenvermehrung erfolgte mit Mitomycin C (Serva, Heidelberg) bei zum Teil verschiedenen Konzentrationen. Die Nährlösungen wurden mit 1 Prozent Uebernachtkultur beimpft, 1½ bis 2½ Stunden vorbebrütet, alsdann zu 10 ml auf die Messröhrchen verteilt und im Wasserbad bebrütet.

Trübungsmessung:

Zur Verfügung stand das Gerät Colorimeter LUMETRON, mit den Filtern 530 nm für Peptonschotte und 650 nm für MRS.

Sterilfiltrat-Herstellung:

Die Proben wurden, wenn nötig, mit Milchsäure angesäuert, zentrifugiert und der Ueberstand mit Millex HA (Millipore), Porenweite 0,45 µm sterilfiltriert. Zur Inaktivierung der Phagen wurden Verdünnungen des Sterilfiltrates in physiologischer Kochsalzlösung 5 Minuten bei 80 °C hitzebehandelt.

Prüfung der Säuerungsfähigkeit:

Sie erfolgte in 10 bzw. 100 ml rekonstituierter 10 prozentiger Pulvermagermilch. Die Impfmenge mit Testkultur betrug 1 Prozent.

Mikroskopie im Phasenkontrast:

Kulturen ohne offensichtlichen Schaden weisen über die ganze Zelle hinweg eine gleichmässige Graufärbung auf. Bei Phagenbefall und möglicherweise auch aus anderen

Gründen verdichtete sich vor allem bei den Laktobazillen die mit Methylenblau färbbare Zellsubstanz an besonderen Zonen oder Punkten der Zelle und hinterlässt wegen der wechselnden Tönung den Eindruck einer **Marmorierung**. Die Zellen der Streptokokken schwellen im Laufe der Phagenreifung deutlich an, die Kokken erscheinen alsdann als **aufgedunsen** (Abbildungen 1 und 2).

3. Resultate

Behandlung der Milchsäurebakterien mit Mitomycin

Mitomycin bringt die meisten lysogenen Bakterien zur Lyse (4). Durch Induktion treten die Prophagen in den lytischen Vermehrungszyklus über und zerstören als virulente Phagen ihren Wirt. In den Versuchen mit der Fettsirtenkultur G betrug die Mitomycin-Konzentrationen 1, 0,5 und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 3).

Abb. 1: Streptokokkus aus Greyerzer-Fettsirtenkultur G, 1. Passage ab Einzelkolonie in Peptonschotte Liebefeld. Aufnahme in Phasenkontrastmikroskop.

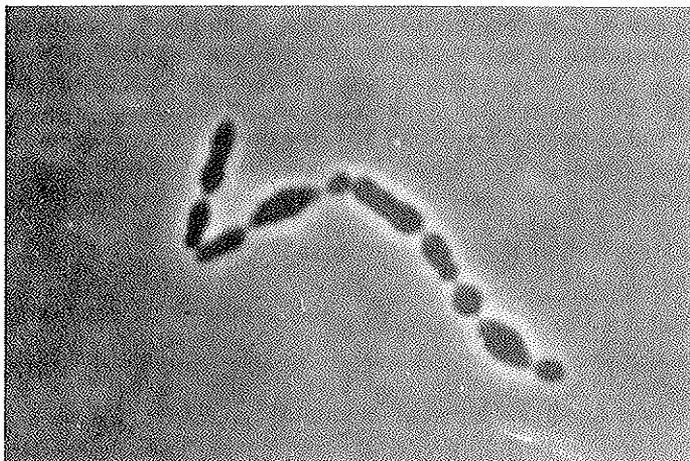
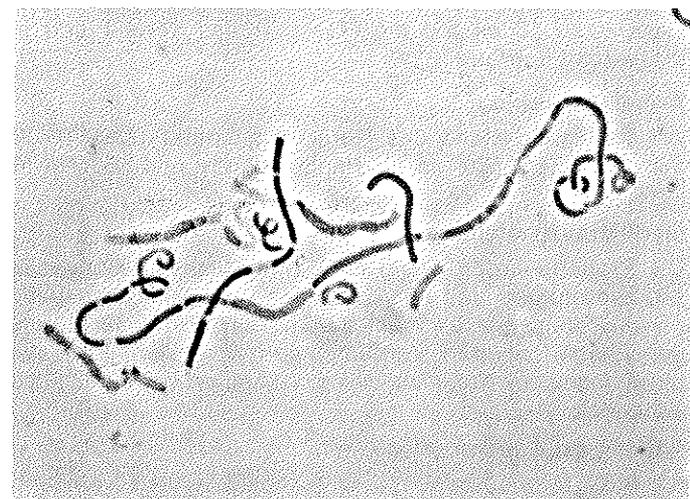
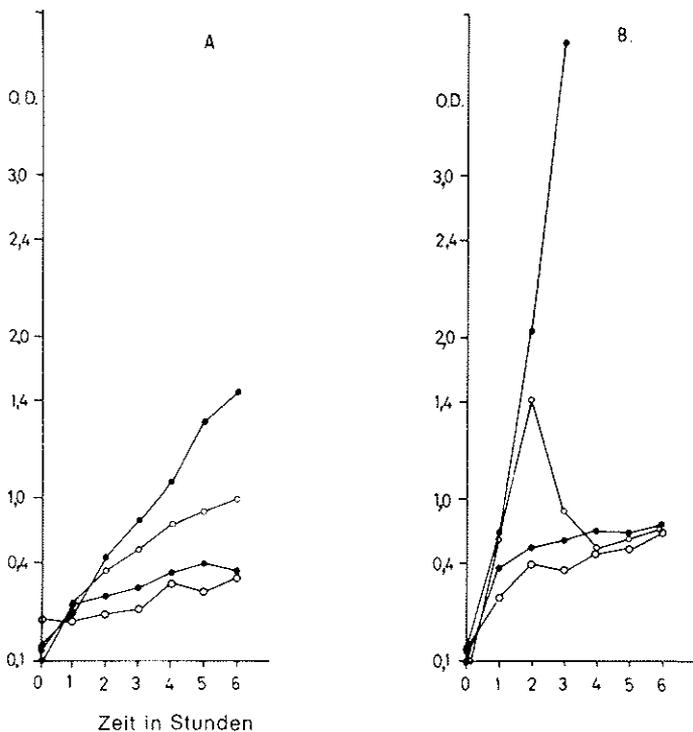


Abb. 2: Laktobazillen in MRS-Bouillon, induziert mit 1 μg Mitomycin/ml. Aufnahme in Phasenkontrastmikroskop.



Da hier wie in anderen Versuchen ein Gemisch von Wildstämmen vorliegt, können Zellneubildungen und Zellyse so nebeneinander laufen, dass die Trübung im Nährmedium nur leicht zu- oder abnimmt oder sich gar nicht ändert. Der Mitomycin-Zusatz hemmt das Wachstum stark. Bei den

Abb. 3: Behandlung der Milchsäurebakterien einer Käseirtenkultur mit Mitomycin. Bebrütungstemperatur 38 °C. A Streptokokken in Peptonschotte Liebefeld, B Laktobacillen in MRS; Mitomycin-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$): Null ● 1 ○, 0,5 ● 0,1 ○



Streptokokken nahm die Trübung nach 5 Stunden Bebrütung in Gegenwart von 0,5 μg Mitomycin/ml ab. Eine starke lytische Phase zeigten die Laktobazillen von der 2. bis 4. Stunde bei 0,1 μg Mitomycin/ml. Das Ausmass der Lyse hängt somit vom Alter der Kultur (Zeit der Bebrütung) wie auch von der Konzentration ab. Weiter geht aus diesen Versuchen hervor, dass die Fettsirtenkultur G, die aus einer gut fabrizierenden Käseirtenkultur stammt und dort optimal säuert, temperente Phagen enthält.

Aehnlich wie diese Fettsirtenkultur reagierten die untersuchten RMK 101 und 104. Die Induktion erfolgte in Anwesenheit von 1 μg Mitomycin/ml. Die Abbildungen 4 bis 7 geben die Wachstumskurven bei den Bebrütungstemperaturen 30 °, 38 ° und 42 °C wieder. Kontrolle und Versuch weichen bei allen 3 Bebrütungstemperaturen voneinander ab. Das Mitomycin hemmt die Entwicklung der einzelnen RMK und der beiden Bakterienarten Streptokokken und Laktobazillen in unterschiedlichem Ausmasse. Die Streptokokken der RMK 101 wiesen bei 30 °C 3 Perioden starker Lyse auf, bei 38 °C und 42 °C nur deren 2. Auch ohne Mitomycin, also in der Kontrollprobe, nahm die Trübung vorübergehend ab, bei 30 °C nach 5 Stunden, bei 38 °C und 42 °C in der 6. Stunde. Die Streptokokken der RMK 104 wuchsen weniger rasch. Einzig bei 30 °C stellte sich eine Trübungsabnahme ein, bei 38 °C und 42 °C hielten sich Zell-Lyse und -Neubildung die Waage.

Die Laktobazillen der RMK 101 wuchsen bei 30 °C langsam, bei den höheren Temperaturen rascher, ihr Wachstum war somit bei der niederen Temperatur eingeschränkt. Im Verlaufe der Bebrütung wechselten bei den Proben mit Mitomycin-Zusatz bei 30 °C und 42 °C Trübungsabnahmen und -zunahmen einander ab; bei 38 °C blieb die Trübungsdichte stationär. Die Laktobazillen der RMK 104 entwickelten sich sowohl bei der niedrigen wie auch bei der hohen

Abb. 4: Nachweis lysogener Streptokokken in der Rohmischkultur 101 durch Induktion mit Mitomycin.
Nährmedium Peptonschotte Liebefeld,
Bebrütungstemperaturen: A 30 °, B 38 °, C 42 °C;
Kontrolle ● Versuch ○ 1 µg Mitomycin/ml + 0,02% CaCl₂.

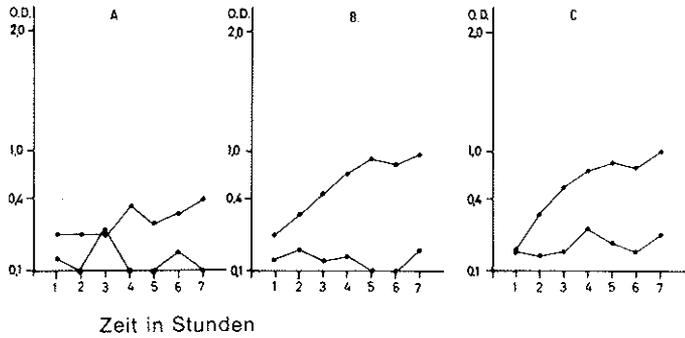


Abb. 5: Nachweis lysogener Streptokokken in der Rohmischkultur 104 durch Induktion mit Mitomycin.
Nährmedium Peptonschotte Liebefeld,
Bebrütungstemperaturen: A 30 °, B 38 °, C 42 °C;
Kontrolle ● Versuch ○ 1 µg Mitomycin/ml + 0,02% CaCl₂.

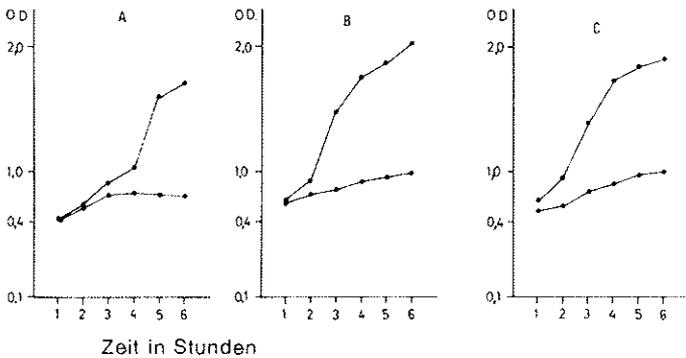
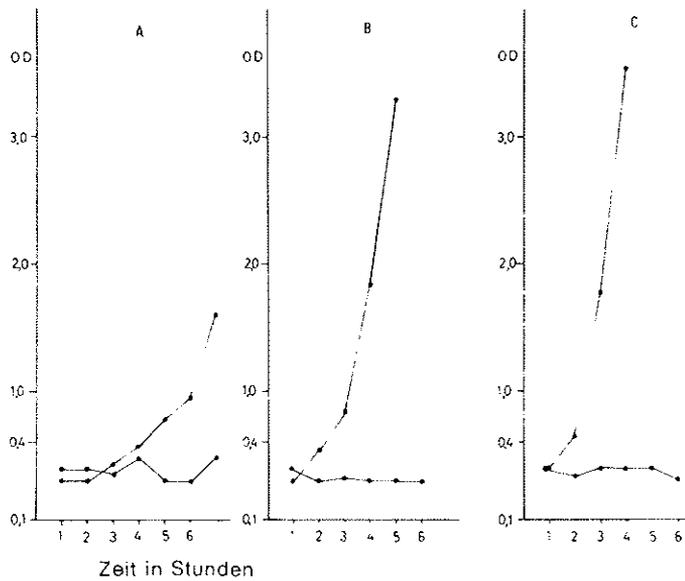
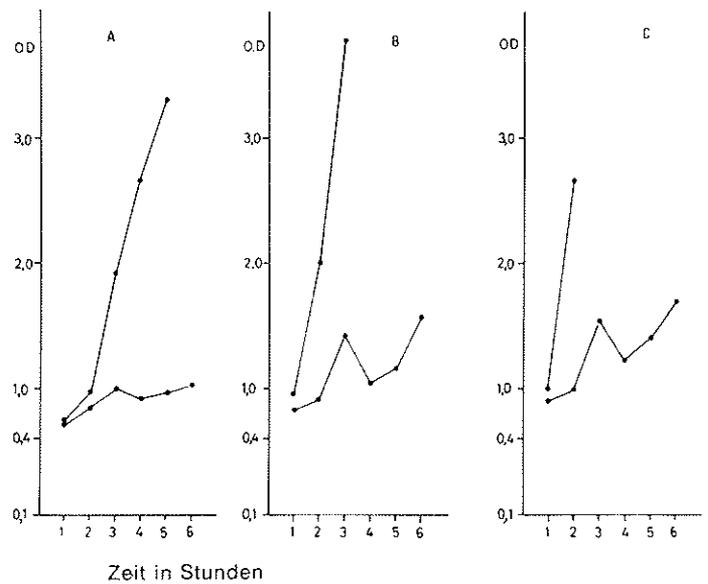


Abb. 6: Nachweis lysogener Laktobacillen in der Rohmischkultur 101 durch Induktion mit Mitomycin.
Nährmedium MRS,
Bebrütungstemperaturen: A 30 °, B 38 °, C 42 °C;
Kontrolle ● Versuch ○ 1 µg Mitomycin/ml + 0,02% CaCl₂.



Temperatur gut. Das Ausmass der Lyse hing jedoch von der Höhe der Bebrütungstemperatur ab.
Bei anderen hier nicht wiedergegebenen Versuchen mit 3 Reinstämmen und 5 weiteren Mischkulturen des EFAM-Versandsortimentes erwiesen sich die Milchsäurebakterien

Abb. 7: Nachweis lysogener Laktobacillen in der Rohmischkultur 104 durch Induktion mit Mitomycin.
Nährmedium MRS,
Bebrütungstemperaturen: A 30 °, B 38 °, C 42 °C;
Kontrolle ● Versuch ○ 1 µg Mitomycin/ml + 0,02% CaCl₂.



ebenfalls als induzierbar. Aufnahmen von Lysaten im Elektronenmikroskop zeigten zum Teil voll ausgebildete Bakteriophagen, aber auch Phagenfragmente (Abbildungen 8 und 9). Gleich wie die Fettsirtenkultur aus der Käseerei G (und andere geprüfte Käseereikulturen) enthalten auch die von der EFAM abgegebenen Kulturen temperente Phagen. Sie gehören aller Wahrscheinlichkeit nach zur normalen Besiedlung einer Rohkultur.

Bakteriophagenbedingte Säuerungsstörungen in Käseereien

Von den Untersuchungen für die Käseereiberatung seien hier 3 ausgewählte Fälle herausgegriffen.

Fall 1:

Eine schwere Säuerungsstörung belastete die Emmentalerkäseerei A. In einer ersten Untersuchung lysierten die Sterilfiltrate der Ausrührsirten die Betriebskulturen RMK 104 und

Abb. 8: Bakteriophagen aus dem Kulturrengemisch *Streptococcus thermophilus* abt EFAM. Kultur mit 1 µg Mitomycin/ml induziert.

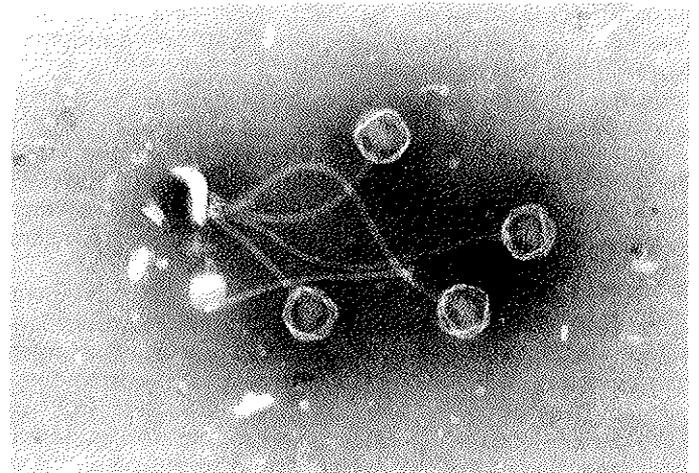
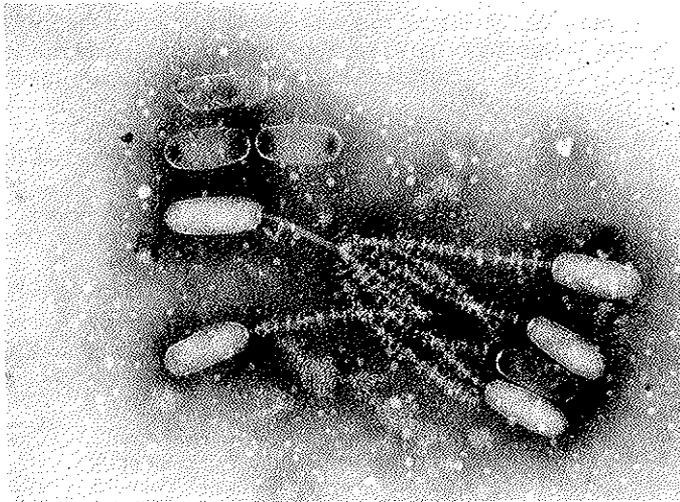


Abb. 9: Bakteriophagen der Laktobazillen aus der Rohmischkultur 119 EFAM, freigesetzt nach der Behandlung mit 1 µg Mitomycin/ml.



Sc. therm. abf. Der Betriebsleiter setzte alsdann ohne Erfolg die Kulturen RMK 101 — 8 Stunden bebrütet — und RMK 105 — 20 Stunden bebrütet — ein. Die Aufgabe bestand nun, eine für den Störbetrieb passende Rohmischkultur ausfindig zu machen.

Das Filtrat der Betriebskultur RMK 101 gefährdete die Streptokokken der RMK 105 und 115, das Filtrat der RMK 105 die Laktobazillen der Kulturen RMK 105 und 150 sowie die Streptokokken der RMK 115 und 119. Die Kulturen der RMK 101 und 104 blieben von den Filtraten fast unbeeinflusst, obwohl im Betrieb die RMK 101, 8 Stunden bebrütet, im Einsatz stand und RMK 104 nur wenige Tage zuvor als Hauptkultur verwendet wurde. Die Störungursache lag in den technisch ungenügenden Einrichtungen der Kulturenherstellung (Kulturengefäße, thermische Behandlung der Milch). Nach deren Behebung wuchs die allein eingesetzte RMK 101 normal.

Bei diesen Untersuchungen stimmten die Ergebnisse der Kontrollprobe und der Probe pasteurisiertes Filtrat in den Säuregraden und noch weniger im mikroskopischen Bild überein. Wahrscheinlich genügten die Pasteurisationsbedingungen 80°C/5 Minuten Heißezeit für die Filtrate nicht, um die Phagen vollständig zu inaktivieren.

Fall 2:

In einer Sbrinzkäserei säuerten die Käse normal. Die Säuregrade der 22 Stunden bebrüteten Ausrührsire und Labgärmolke lagen ausserordentlich tief, wenn zum Einlaben ausser RMK 302 noch betriebseigene Fettsirtenkultur verwendet wurde. Die Fettsirte, nach der Entnahme aus dem Kessi kurz auf 58°C erhitzt, erhielt als Starthilfe das Stammgemisch Sc. therm. abf eingepflegt.

Von der Fettsirtenkultur wurde ein Sterilfiltrat hergestellt. Vorversuche mit und ohne Filtrat, pasteurisiertem Filtrat und den Kulturen Sc. therm. abf, RMK 302 zeigten, dass der Filtratzusatz einzig die Streptokokken der RMK 302 schädigte. Die Fettsirtenkultur selbst, im Besatz schwach, bildete in Pulvermagermilch wenig Säure und reagierte auf den Filtratzusatz nicht.

Allein nach der Höhe der Säuregrade zu schliessen, lag hier keine Säuerungsstörung vor. Das Filtrat stimulierte sogar die Säurebildung bei der Behandlung im Kurventhermostaten. Die Bakterienflora setzte sich jedoch unterschiedlich zusammen. Mit Filtrat, bei 38°C bebrütet, wogen die Laktobazillen leicht vor. In den im Kurventhermostat bebrüteten Proben fehlten die Streptokokken beim

Tabelle 1: Ermittlung einer passenden Rohmischkultur für den Störbetrieb A

Testkulturen: Versandkulturen EFAM, Impfmenge 1%; Sterilfiltrate von den Käsereikulturen RMK 101 (Filtrat 1) und RMK 105 (Filtrat 2), Impfmenge 0,1‰; Bebrütung 15 Stunden bei 38°C (Lb = Laktobazillen, Sc = Streptokokken)

Kultur	Filtratzusätze	Pulvermagermilch		
		°SH	Mikroskopisches Bild	Lb : Sc
RMK 101	—	37	normales Aussehen	1 : 5
	1	38	normales Aussehen	1 : 20
	1 past.	38	normales Aussehen	1 : 20
	2	38	vereinzelte marmorierte Lb	1 : 40
RMK 104	2 past.	37	normales Aussehen	1 : 20
	—	37	normales Aussehen	1 : 10
	1	38	einzelne gedunsene Sc	1 : 5
	1 past.	39	normales Aussehen	1 : 5
RMK 105	2	37	normales Aussehen	1 : 15
	2 past.	39	normales Aussehen	1 : 15
	—	44	normales Aussehen	1 : 2
	1	36	marmorierte Lb, einzelne gedunsene Sc	2 : 1*
RMK 115	1 past.	46	normales Aussehen	1 : 1
	2	31	Lb fehlen fast ganz	1 : >100
	2 past.	46	normales Aussehen	2 : 1
	—	43	einzelne marmorierte Lb	1 : 1
RMK 119	1	29	marmorierte Lb, wenige gedunsene Sc	3 : 1*
	1 past.	38	marmorierte Lb	1 : 1
	2	26	wenige marmorierte Lb, gedunsene Sc	1 : 2*
	2 past.	45	einzelne gedunsene Sc	1 : 1
RMK 150	—	49	normales Aussehen	1 : 1
	1	46	wenige marmorierte Lb, gedunsene Sc	1 : 1
	1 past.	51	wenige marmorierte Lb, gedunsene Sc	1 : 1
	2	33	viele gedunsene Sc	2 : 3**
RMK 150	2 past.	51	wenige marmorierte Lb	1 : 1
	—	47	normales Aussehen	1 : 3
	1	41	normales Aussehen	1 : 3
	1 past.	49	wenige marmorierte Lb	1 : 2
RMK 150	2	35	keine Lb	—
	2 past.	49	normales Aussehen	1 : 1

* mit Filtrat 2. Passage: keine Sc!

** mit Filtrat 2. Passage: schwacher Besatz

Tabelle 2: Einfluss einer Sbrinz-Fettsirtenkultur, sterilfiltriert, auf das Säuerungsvermögen der RMK 302 in Pulvermagermilch (Lb = Laktobazillen, Sc = Streptokokken) (Bebrütungszeit 15 Stunden)

Bebrütung	Filtratzusatz	°SH	Mikroskopisches Bild	Lb : Sc
Brut-	—	51	sehr vereinzelte marmorierte Lb	1 : 2
schränk	0,1‰	51	normales Aussehen	2 : 1
Kurven-	0,001‰	51	vereinzelte gedunsene Sc	3 : 1
thermostat	—	53	normales Aussehen	1 : 1
	0,1‰	58	Streptokokken fehlen	—
	0,001‰	54	viele aufgedunsene Sc	1 : 3

Filtratzusatz 10⁻⁴/ml; bei 10⁻⁶/ml dagegen waren sie gut vertreten, ihre Kokken jedoch aufgedunsen. Das Erhitzen der Fettsirte auf 58°C beim Ansetzen der Kultur und die Wärmebehandlung im Kurventhermostat mit der Brenntemperatur von 56°C für Sbrinz führten zur vermehrten Lyse der Streptokokken. Die tiefen Säuregrade der Ausrührsire und Labgärmolke deckten somit eine latente, phagenbedingte Säuerungsstörung auf. Ihr Ausbruch hing, wie die wechselnde Filtratimpfmenge anzeigt, auch vom Phagentiter ab.

Fall 3:

In einer Emmentalerkäserei, wo die Molke an die Lieferanten zurückgegeben wird, trat eine Säuerungsstörung auf. Um die Herkunft der Störung abzuklären, setzte man den Lieferanteneinzelmilchen Lab und RMK 105 zu und bebrütete diese 22 Stunden bei 38 °C. Vier Proben fielen durch einseitige Florazusammensetzung auf. Die Sterilfiltrate davon (= 1. Passage) und von der folgenden Passage 2 wurden in einem Säuerungstest auf ihre Wirkung geprüft. In Gegenwart der Sterilfiltrate (Proben Nr. 2, 3 und 4) säuerte die Testkultur RMK 105 schwach (Tabelle 3). Ihr Effekt verstärkte sich mit dem 2. Passagfiltrat. Die Filtrate 3 und 4 eliminierten aus der Mischkultur die Streptokokken, das Filtrat 2 in der 1. Passage die Laktobazillen, in der 2. Passage vor allem die Streptokokken. Im Gegensatz dazu änderten die hitzeinaktivierten Filtrate das Laktobazillen-Streptokokken-Verhältnis und die Säuregrade nicht. Die Lieferantenmilch brachte somit aktive Phagen in die Käserei.

Tabelle 3: Nachweis von Bakteriophagen in Lieferantenmilch nach Aktivierungspassagen
Testkultur RMK 105, Impfmenge 1%, Bebrütung 1. Passage 17 Stunden, 2. Passage 16 Stunden bei 38 °C. Sterilfiltrate s. Text! (Lb = Laktobazillen, Sc = Streptokokken)

Proben	Sterilfiltrat		Pulvermagermilch		Lb : Sc
	Passage	Impfmenge	°SH	Mikroskopisches Bild	
Kontrolle	1	—	46	normales Aussehen	1 : 6
	2	—	40	normales Aussehen	2 : 3
1	1	2‰	44	vereinzelte marmorierte Lb	1 : 2
	2	1	2‰	30	keine Lb
2	2	1‰	13	marmorierte Lb, keine Sc	—
	1	1‰ past.	40	vereinzelte marmorierte Lb, keine Sc	2 : 3
3	1	2‰	23	normale und marmorierte Lb, keine Sc	—
	2	1‰	9	viele Zellrümer, keine Sc	—
4	2	1‰ past.	40	normales Aussehen	1 : 4
	1	2‰	32	vereinzelte marmorierte Lb, keine Sc	—
2	2	1‰	27	vereinzelte marmorierte Lb, keine Sc	—
	2	1‰ past.	40	normales Aussehen	1 : 3

4. Diskussion

Fettsirtenkulturen der Hartkäseereien und die Versandkulturen der EFAM enthalten Bakterien, die bei Anwesenheit von Mitomycin lysieren. Aufnahmen im Elektronenmikroskop bestätigten in den Lysaten das Vorkommen voll ausgebildeter Bakteriophagen. Solche Phagen dürften in den Rohmischkulturen, wenn auch in niedriger Anzahl, immer vorkommen, da Spontaninduktionen bei lysogenen Kulturen die Regel sind.

Die Frage, ob eine echte oder scheinbare Lysogenie vorliegt, wurde hier nicht geprüft. Im Gegensatz zum anerkannten Nachweisverfahren liefen unsere Versuche ohnehin mit Mischkulturen. Lysogenie stellte man bei verschiedenen Laktobazillen-Spezies fest (5, 6, 7). YOKOKURA und Mitarbeiter (5) fanden die Mitomycin-Induktion abhängig von der Konzentration, der Temperatur und vom Alter der Kultur, was unsere Versuche bestätigten. Lysogenie kommt auch bei den mesophilen Starterkulturen vor (8). Solche Angaben fehlen für *Streptococcus thermophilus*.

Einen gewissen Einblick über das Wirtsspektrum der Phagen aus einem Störbetrieb vermittelt Tabelle 1. Die Sterilfiltrate der Betriebskulturen setzten die Säuerungsaktivität verschiedener, von einander unabhängigen Rohmischkulturen herab und eliminierten zum Teil einzelne Bakteriengruppen vollständig.

Die Lieferantenmilchen können ebenfalls zu den phagenbedingten Säuerungsstörungen beitragen. Der Phagen-

nachweis gelingt sicherer über Aktivierungspassagen (Tabelle 3).

Das Erhitzen der Fettsirte unmittelbar vor dem Bebrüten ist in vielen Käseereien üblich; die Massnahme soll unerwünschte Keime aus der Fettsirtenkultur fernhalten. Im Falle der Sbrinzkäserei (Tabelle 2) entriegelte das kurze Erwärmen den Temperatur-Restriktionsmechanismus der Milchsäurebakterien, worauf sich die Phagen ungehindert vermehren konnten. Solche Beobachtungen von Temperatur-Restriktionen wurden u. a. bei *Bacillus subtilis* und zwischen *Streptococcus lactis* und *Streptococcus cremoris* (9, 10) gemacht.

Résumé

Insuffisance de l'acidification provoquée par des bactériophages dans la fabrication de fromages à pâte dure

Des cultures de fromagerie de petit-lait gras et des cultures mixtes brutes de la Station fédérale de recherches laitières à Liebefeld-Berne ont été traitées à la mitomycine. L'induction a conduit à la lyse des lactobacilles et des streptocoques. Des images de lysats au microscope électronique ont révélé la présence de bactériophages entièrement développés.

Des cultures produites dans la fromagerie et des échantillons de lait fermenté stérilisés par filtration contenaient des bactériophages actifs. Ils ont été détectés indirectement au moyen d'épreuves d'acidification et de contrôles au microscope en contraste de phase. La perturbation de l'acidification a été décrite à l'aide de trois exemples offerts par la pratique fromagère.

Summary

Insufficient acid production due to bacteriophages in hard-cheese manufacture

Whey cultures from cheese factories and raw mixed cultures of the Swiss Federal Dairy Research Institute in Liebefeld-Berne were treated with mitomycin. Induction led to the lysis of lactobacilli and streptococci. Electron microscopic images showed the presence of fully developed bacteriophages.

Bulk starters produced in the cheese factory and fermented milk samples sterilized by filtration were found to contain active bacteriophages. They were detected indirectly by means of acidification tests and phase-contrast microscopy controls. Three cases of insufficient acid production in cheese factories due to bacteriophage disturbance are described.

Literatur

- 1 STEFFEN, C.: Lebensmittel-Wiss. und -Technologie **8**, 1—6 (1975)
- 2 JOHNS, F. E., GORDON, J. F. und SHAPTON, N.: J. Soc. Dairy Techn. **31**, 209—212 (1978)
- 3 DE MAN, J. C., ROGOSA, M. und SHARPE, M. E.: J. appl. Bact. **23**, 130—135 (1960)
- 4 BRADLEY, D. E.: Bact. Reviews **31**, 230—314 (1967)
- 5 YOKOKURA, T., KODAIRA, S., HIROMI ISHIWA und SAKURAI, T. General Microbiol. **84**, 277—284 (1974)
- 6 SAKURAI, T., TAKAHASHI, T. und ARAI, H.: Japan J. Microbiol. **14**, 333—336 (1970)
- 7 COETZEE, J. N. und DE KLERK, H. C.: Nature **193**, 505 (1962)
- 8 HUGGINS, A. R. und SANDINE, W. E.: Appl. Environm. Microbiol. **33**, 184—191 (1977)
- 9 GWINN, D. D. und LAWTON, W. D.: Bact. Reviews **32**, 297—301 (1968)
- 10 PEARCE, L. E. und LOWRIE, R. E.: XIX. Intern. Milchw. Kongress Indien **1D**, 445—446 (1974)

Verdankung

Die Aufnahmen im Elektronenmikroskop führte Dr. Rüegg aus. Technische Assistenz leisteten F. Bettens und M. Pop. Für ihre Mithilfe sei bestens gedankt.