

# Hitzeresistenz von Bakteriophagen mesophiler und thermophiler Milchsäurebakterien

Von J. Dietrich, H. Neve und K.J. Heller

Institut für Mikrobiologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel – Standort Kiel, Postfach 6069, D-24103 Kiel

## 1. Einleitung

Bakteriophagen (Phagen) sind Viren, die zur ihrer Vermehrung auf stoffwechselaktive Wirtsbakterien angewiesen sind. Nach neueren Schätzungen beträgt die Anzahl der auf der Erde vorhandenen Phagen  $10^{31}$  bis  $10^{32}$  und übertrifft damit die Gesamtzahl der Bakterien auf der Erde um den Faktor von ca. 10 (5). In milchverarbeitenden Betrieben werden Milchsäurebakterien als Starterkulturen in großen Volumina und in hoher Konzentration eingesetzt. Dort führen Bakteriophageninfektionen zu zeitlichen Verzögerungen im Produktionsablauf, zu Fehlchargen, zu Qualitätsverlusten oder im Extremfall auch zu Totalverlusten (20, 31). Ungefähr 1 bis 10 % aller Milchfermentationen sind nach vorsichtigen Schätzungen davon betroffen, vermutlich bleiben aber viele Phageninfektionen unerkannt (16).

Die beiden Hauptinfektionswege, über die die Phagen in die Betriebe gelangen, sind gut beschrieben. Viele Starterkulturen sind lysogen und tragen Prophagen-DNA im Genom. Insbesondere bei den Laktokokken ist die Lysogenierate sehr hoch. Dazu kommt, dass einzelne Stämme multilyso-gen sein können und bis zu 6 Prophagen oder Prophagenfragmente enthalten (10). Intakte Prophagen können spontan oder unter Stressbedingungen als temperente Phagen freigesetzt werden. Phagen der Milchsäurebakterien sind auch in niedriger Zahl ( $10^1$  bis  $10^4$  pro ml) in der Rohmilch nachzuweisen (6, 27, 32). Da die Milch aus vielen unterschiedlichen Betrieben gesammelt und vorgestapelt wird, ist mit einer hohen Diversität der Phagenpopulationen in der Rohmilch zu rechnen. Seit langem ist bekannt, dass ein Teil der Phagenpopulation die üblichen Pasteurierungsbedingungen der Milch überleben kann (9, 27, 36, 45, 46).

In dem AiF-Projekt 14339N sollte für die Bestimmung der Thermostabilität von Phagen der Milchsäurebakterien ein möglichst umfassendes Spektrum aller bekannten Phagenvertreter untersucht werden. Ziel des Projektes war, für die am weitesten verbreiteten Starterkulturen der mesophilen oder thermophilen Milchsäurebakterien einen „Testphagen“ zu identifizieren, der eine hohe Thermoresistenz aufweist und als Marker für die Erhitzung dienen kann. Die zu untersuchenden Phagen des gemeinsam mit der Univ. Hohenheim durchgeführten Projektes wurden aus zwei Quellen bereitgestellt: (I) neue „Feld“-Betriebsphagen aus einer aktuellen Probenerhebung (36), (II) Phagen aus der Kieler (IfM) Phagensammlung und aus externen Phagensammlungen.

Dabei wurden sowohl Phagen der mesophilen (*Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*) als auch Phagen der thermophilen (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*) Milchsäurebakterien analysiert.

## 2. Material und Methoden

### Wirtsstämme

Die mesophilen Wirtsstämme der Phagen wurden in LM17-Medium (*L. lactis*) (43) oder in MRS-Medium (*Ln. mesenteroides*) (13) bei 30°C angezüchtet. Die Anzucht der thermophilen Wirtsstämme erfolgte in einem modifizierten LM17-Medium (*thM17* für *S. thermophilus*-Stämme) (22, 42) und in MRS-Medium (*Lb. delbrueckii*-Stämme) bei 40°C.

Zur Langzeitlagerung wurden frische Kulturen 1 %ig in Lackmusmilch überimpft, für 2 h bei 30°C bzw. 40°C inkubiert, und bei -70°C eingefroren. Bei schlecht säuernden *L. lactis*-, *Ln. mesenteroides*- und *Lb. delbrueckii*-Stämmen wurde Lackmusmilch angereichert mit 0,3 % Hefeextrakt und 1 % Glucose (HGL-Milch) verwendet.

### Phagen

Für die Anzucht der Phagen wurde den Medien 10 mM CaCl<sub>2</sub> zugesetzt. 100 µl des jeweiligen Phagenlysats wurden mit 300 µl einer spätlogarithmischen Wirtskultur versetzt. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, und anschließend wurden 5 ml des jeweiligen Wachstumsmediums hinzugegeben. Der Ansatz wurde bis zur Lyse inkubiert und danach sterilfiltriert (0,45 µm Porenweite [Whatman, Dassel]). Für Ansätze im größeren Volumen wurden die Mengen entsprechend hochgerechnet. Zur Langzeitlagerung wurden die Phagenlysate mit 10 % Glycerin versetzt und bei -70°C eingefroren.

### Plaquetest (1)

Die Phagenlysate wurden in seriellen Verdünnungsreihen in Phagenverdünnungslösung (¼-starke Ringerlösung [Merck, Darmstadt] mit 10 % LM17-Medium) verdünnt. Für den Plaquetest nach der Weichagar-Doppelschicht-Methode wurden 100 µl dieser Verdünnungen mit 300 µl einer spätlogarithmischen Wirtskultur gemischt. Die Ansätze wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 2,5 ml geschmolzenem Weichagar (50°C) auf Nährboden aufgetragen. Für die *S. thermophilus* Wirtsstämme wurden je 100 µl Magermilch hinzugefügt. Für die *S. thermophilus*-Wirte mit schwacher Plaquebildung wurde dem Unterschichtagar 0,25 % Glycin zugegeben (modifiziert nach (25)). Der Weichagar (Topagar) wurde ebenfalls mit Glycin versetzt und nur in der Mikrowelle kurz aufgeköcht. Die Platten wurden über Nacht bei 30°C bzw. 40°C inkubiert.

### Herstellung von Phagenlysaten für die Erhitzungsversuche

Agarplatten der Plaquetests mit konfluenter Lyse im Bakterienrasen wurden mit je 5 ml des entsprechenden Suspensionsmediums geflutet. Diese wurden für 1 h bei Raumtemperatur leicht geschüttelt, anschließend wurde die Suspension sterilfiltriert (Filterporenweite 0,45 µm). Als Suspensionsmedien wurden rekonstituierte Magermilch (Merck, Darmstadt) und Reinstwasser (Anlage: Ultra Clear UV plus, SG, Barsbüttel) verwendet.

### Thermische Inaktivierung der Phagen

Für die thermische Inaktivierung wurden hochtitrige Phagensuspensionen (hergestellt in rekonstituierter Magermilch und Reinstwasser) in 1,5-ml Edelstahlröhrchen mit Schraubverschlüssen luftblasenfrei gefüllt. Es wurden jeweils zwei Röhrchen parallel im Wasserbad erhitzt. Innerhalb 1 min hatte die Suspension im Röhrchen die Temperatur des Wasserbads erreicht. Das erste Röhrchen wurde nach 1 min entnommen und diente zur Ermittlung der Titerreduktion in der Aufheizphase. Das zweite Röhrchen wurde nach

einer weiteren Minute entnommen und diente zur Ermittlung der Titerreduktion nach 1 min Erhitzung (Heißhaltephase). Die Röhrchen wurden nach der Entnahme aus dem Wasserbad sofort im Eisbad gekühlt. Der Phagen-Resttiter wurde im Plaquetest bestimmt. Waren nach der Erhitzung noch aktive Phagen nachweisbar, wurde die Temperatur in 5°C-Schritten erhöht und die thermische Inaktivierung mit unerhitzter Phagensuspension wiederholt.

#### Elektronenmikroskopie

Die Phagenlysate wurden nach einer Negativkontrastierung mit 2 % Uranlyacetat (Plano, Wetzlar) im Tecnai 10 Transmissionselektronenmikroskop (Fei Company, Eindhoven) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV fotografiert (CCD-Kamera: Megaview II; SIS, Münster). Die Bildanalyse erfolgte mit der analySIS Docu 3.2 Software (Soft Imaging SIS, Münster).

### 3. Ergebnisse

#### *L. lactis* Phagen

Phagen der Laktokokken weisen eine breit gefächerte Biodiversität auf (Abb. 1). Die *L. lactis* Phagen werden derzeit in 10 unterschiedliche Phagenspecies unterteilt, die sich morphologisch und genetisch voneinander unterscheiden lassen (15). Neun der 10 Species beinhalten ausschließlich virulente Phagen. Eine Besonderheit stellt die P335-Phagengruppe dar, da sie sowohl virulente als auch temperente Phagen enthält, die sich auch in weitere morphologisch unterscheidbare Untergruppen unterteilen lassen. Daher wird die P335 Phagengruppe auch als „polythetische“ Phagenspecies bezeichnet. Zur besseren Identifizierung werden in der vorliegenden Publikation die P335-Untergruppen mit in die Speciesbezeichnung aufgenommen und als P335-[r1t]-, P335-[P335]-, und P335-[BK5-T]-Phagen bezeichnet. Die genetische Verwandtschaft zwischen den P335-Phagen ist sehr unterschiedlich und kann im Extremfall auf die Präsenz eines einzigen homologen dUTPase-Gens reduziert sein (23). Mit Ausnahme der beiden seltenen Phagenspecies 1706 und KSY1 wurden Vertreter aller anderen Phagenspecies in die Untersuchungen einbezogen. Die beiden Phagen KSY1 und 1706 stellen nur Einzelisolate dar, die aus finnischer Dickmilch (Phage KSY1 (11)) und aus französischem Käse (Phage 1706 (18)) isoliert worden waren.

Für die Inaktivierungsversuche wurden zwei praxisnahe Suspensionsmedien ausgewählt – Magermilch und Reinstwasser. In einer früheren Arbeit ist bereits gezeigt worden, dass Milch einen schützenden Effekt bei der thermischen Inaktivierung des *L. lactis* Phagen P008 hat (34).

Die Übersicht der thermischen Inaktivierung der 29 untersuchten Laktokokkenphagen dokumentiert eine deutlich erkennbare Korrelation der Hitzestabilität mit der Phagenspezies (Tabelle 1). Mit Ausnahme der P335-[P335]- und der 936-Phagen zeigten Phagenvertreter einer Phagenspecies auch ein einheitliches Muster der thermischen Inaktivierung innerhalb einer 5°C Spannbreite. In die Gruppe der hitzesensitivsten Laktokokkenphagen ließen sich alle Phagenisolate der 949- und der P335-[BK5-T] Species einordnen. Phagen dieser beiden Spezies wurden komplett bei 60-65°C inaktiviert. Diese isodiametrischen *Siphoviridae*-Phagen weisen im Vergleich zu den anderen Laktokokkenphagen lange flexible Schwänze auf (Schwanzlänge: 240 nm bei den P335-[BK5-T]-Phagen und ca. 500 nm bei den 949-Phagen) (Abb. 1). Für die komplette Inaktivierung der 949-Phagen in Milch musste im Vergleich zu den Versuchen in Wasser die Temperatur von 60°C auf 65°C heraufgesetzt werden (Tabelle 1).

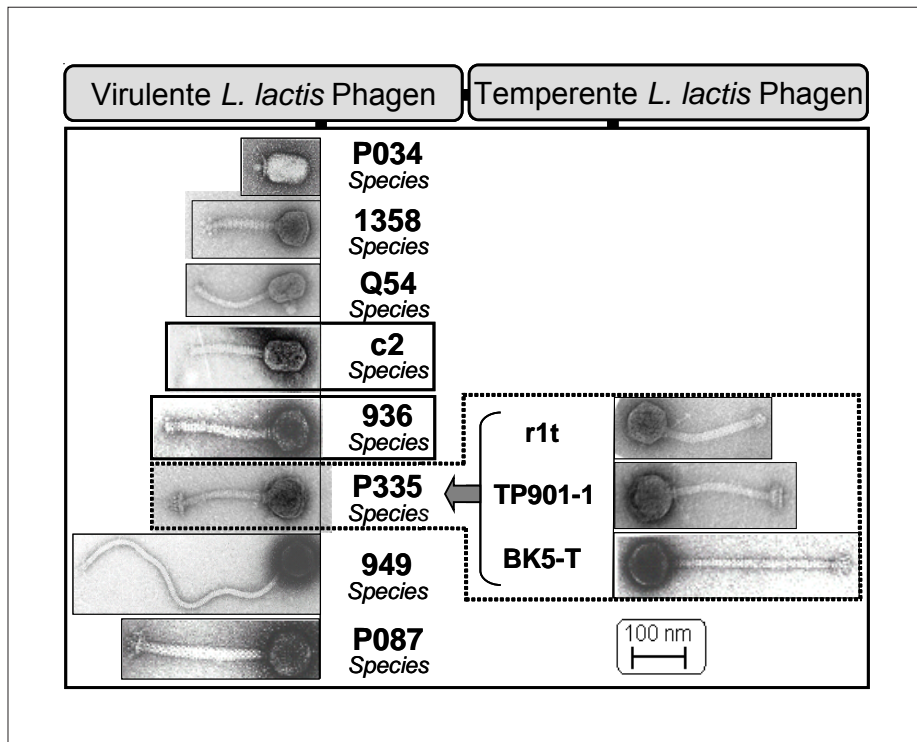


Abb. 1: Übersichtsdarstellung der 8 *L. lactis* Phagenspecies, die in dieser Studie untersucht wurden (modifiziert nach (15) und (20)). Die weit verbreiteten strikt virulenten 936- und c2-Phagen sind umrahmt. Der gestrichelte Rahmen umfasst die unterschiedlichen Untergruppen der P335-Phagenspecies, bei der sowohl virulente als auch temperente Phagen bekannt sind. Nicht aufgeführt sind die seltenen Phagenspecies KSY1 (11) und 1706 (18). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind im gleichen Vergrößerungsmaßstab gezeigt.

Die Mehrzahl der Phagen wurde durch Temperaturen von 70°C (Phage 1358), von 75-80°C (P087-Phagen mit isodiametrischen Köpfen und P034-, Q54- und c2-Phagen mit prolaten Köpfen) oder von 80-85°C (P335-[r1t]-Phagen) inaktiviert (Tabelle 1). Ein breiteres Spektrum der Inaktivierungstemperatur von 70-85°C wiesen die P335-[P335] auf. Ein bemerkenswert uneinheitliches Inaktivierungsmuster zeigten jedoch die 936-Phagen: Während die „alten“ 936-Phagen, die vor mehreren Jahrzehnten isoliert worden waren, bereits bei 80°C vollständig inaktiviert wurden (Phagen 936 (26) und P008 (19)), zeigten mehrere „neue“ 936-Phagenisolate eine sehr hohe Thermoresistenz (Tabelle 1). Diese hitzestabilen Phagen waren im Rahmen des AiF-Projektes in einer umfangreichen Phagenerhebung in deutschen Molkereien isoliert worden (36). Die Titerreduktion der hitzestabilsten Phagen P1532 und P680 war bei einer Testtemperatur von 80°C kaum erfassbar (< 1 log-Einheit). Im Suspensionsmedium Wasser wurden sie erst bei 100°C vollständig inaktiviert, während sie in Milch unter diesen thermischen Bedingungen noch im geringen Titer überlebten.

**Tab. 1: Thermische Inaktivierung der Phagen mesophiler Milchsäurebakterien (*Lactococcus lactis* und *Leuconostoc mesenteroides*) in Magermilch und Wasser nach einer Heißhaltezeit von 1 min. Die Phagen wurden in hohen Titern erhitzt. Der Buchstabencode zeigt an, dass Phagen nach der Erhitzung noch in Milch (M) oder in Wasser (H) im Plaquetest nachzuweisen waren. Die kritische Temperatur zur vollständigen Inaktivierung ist mit „-“ Symbolen angegeben und schwarz unterlegt (Nachweisgrenze: 2 Plaquet-bildende Einheiten pro ml).**

<i>L. lactis</i>		Phage	Ref.	max. Titer [PbE/ml]	Inaktivierungstemperatur [°C]									
Phagen-species					55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
<b>P335-[BK5-T]</b>	BK5-T	[28]	4x10 <sup>8</sup>	MH	--	..	..	..	..	..	..	..	..	..
	P606	MBT	7x10 <sup>7</sup>	MH	--	..	..	..	..	..	..	..	..	..
	P553	CP1	2x10 <sup>8</sup>	MH	MH	--	..	..	..	..	..	..	..	..
	P572	CP1	9x10 <sup>8</sup>	MH	MH	--	..	..	..	..	..	..	..	..
	PC412	CP2	8x10 <sup>8</sup>	MH	MH	--	..	..	..	..	..	..	..	..
	<b>949</b>	P570	[39]	2x10 <sup>8</sup>	MH	M	--	..	..	..	..	..	..	..
		PC21	CP2	2x10 <sup>8</sup>	MH	MH	--	..	..	..	..	..	..	..
		PC310	CP2	1x10 <sup>7</sup>	MH	M	--	..	..	..	..	..	..	..
	<b>1358</b>	P1404	[19]	1x10 <sup>8</sup>	..	..	MH	--	..	..	..	..	..	..
		P034	[4]	3x10 <sup>8</sup>	..	..	MH	M	--	..	..	..	..	..
	<b>P034</b>	P369	MBT	3x10 <sup>8</sup>	..	..	MH	M	--	..	..	..	..	..
		P335	[23]	3x10 <sup>7</sup>	..	..	MH	MH	--	..	..	..	..	..
	<b>P335</b>	P581	CP1	4x10 <sup>8</sup>	..	..	MH	MH	MH	--	..	..	..	..
		TP901-1	[7]	1x10 <sup>8</sup>	..	..	MH	MH	MH	M	--	..	..	..
		P335-[r1t]	r1t	[44]	5x10 <sup>7</sup>	..	..	MH	MH	MH	--	..	..	..
<b>P335-[r1t]</b>	P566	CP1	2x10 <sup>8</sup>	..	..	MH	MH	MH	--	..	..	..	..	
	P706	MBT	5x10 <sup>8</sup>	..	..	MH	MH	MH	MH	--	..	..	..	
	P087	[39]	2x10 <sup>7</sup>	..	..	MH	MH	--	..	..	..	..	..	
<b>P087</b>	P087	[4]	1x10 <sup>8</sup>	..	..	MH	MH	MH	--	..	..	..	..	
	<b>c2</b>	P001	[4]	2x10 <sup>8</sup>	..	..	MH	MH	--	..	..	..	..	..
PC204		CP2	3x10 <sup>7</sup>	..	..	..	MH	M	--	..	..	..	..	
PC364		CP2	1x10 <sup>10</sup>	..	..	..	MH	MH	--	..	..	..	..	
PC649		CP2	7x10 <sup>9</sup>	..	..	..	MH	MH	--	..	..	..	..	
<b>Q54</b>	Q54	[17]	4x10 <sup>8</sup>	..	..	MH	MH	MH	--	..	..	..	..	
	<b>936</b>	936	[19]	1x10 <sup>8</sup>	..	..	MH	MH	MH	--	..	..	..	..
P008		[26]	1x10 <sup>8</sup>	..	..	MH	MH	MH	--	..	..	..	..	
P1569		[36]	4x10 <sup>8</sup>	..	..	..	MH	MH	MH	MH	--	..	..	
P1532		[36]	2x10 <sup>8</sup>	..	..	..	..	..	MH	MH	MH	MH	M	
P680		[36]	6x10 <sup>7</sup>	..	..	..	..	..	MH	MH	MH	MH	M	
<b><i>Ln. mesenteroides</i></b>					Inaktivierungstemperatur [°C]									
	Phage	Ref.	max. Titer [PbE/ml]	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
	P958	CP1	3x10 <sup>7</sup>	..	..	MH	M	M	M	--	..	..	..	
	P728	CP1	5x10 <sup>7</sup>	..	..	MH	M	M	M	--	..	..	..	
	P4556	CP1	3x10 <sup>7</sup>	..	..	MH	MH	M	--	..	..	..	..	

MH Phagen nach 1-min Erhitzung in Magermilch (M) und Wasser (H) im Plaquetest nachweisbar.  
M Phagen nur noch in Magermilch (M) nachweisbar.  
-H Phagen nur noch in Wasser (W) nachweisbar.  
-- Phagen weder in Magermilch noch in Wasser nachweisbar (Nachweisgrenze: 2 PbE/ml).  
.. Keine Erhitzung durchgeführt  
MBT: Institutsphagensammlung: CP1 / CP2: Phagen der Kulturenhersteller 1 und 2  
PBE: Plaquet-bildende Einheiten

Insgesamt gesehen stellt somit die Temperatur von 80°C (1-min Heißhaltezeit) eine Hürde dar, die nur von wenigen *L. lactis* P335- und 936-Phagen überschritten werden kann. Die beiden 936-Phagen P1532 und P680 wiesen die höchste Thermoresistenz auf und wurden im AiF-Projekt daher als Modellphagen für die genaue Bestimmung ihrer Inaktivierungskinetiken herangezogen (36). Die Mehrzahl der untersuchten *L. lactis*-Phagen ließ sich in den beiden Suspensionsmedien Milch und Wasser bei gleicher Temperatur komplett inaktivieren. Ein schützender Effekt der Milch wurde nur bei einigen *L. lactis* Phagen dokumentiert (alle P034-Phagen, einige 949-, P335-[TP901-1], c2- und 936-Phagen). Für die Praxis ist dabei allerdings der Schutzeffekt der Milch für die extrem thermostabilen Phagen P1532 und P680 bei thermischen Bedingungen kurz unterhalb der kritischen Inaktivierungstemperatur bedeutend (Tabelle 1). In anderen Studien konnte ein schützender Effekt von Milch auf die Hitzestabilität von *L. lactis* Phagen auch gezeigt werden (21, 34).

Die hohe Variabilität der Thermostabilität von *L. lactis* Phagen ist bereits dokumentiert (9, 41, 45). Allerdings ist es kaum möglich, die Daten untereinander zu vergleichen, da die Erhitzungsversuche in unterschiedlichen Suspensionsmedien und auch in unterschiedlichen Volumina und Versuchsgefäßen durchgeführt wurden. Als Suspensionsmedien wurden die komplexen Wachstumsmedien der Wirtskulturen (z.B. (8, 35)), verschiedene Salz- und Pufferlösungen (z.B. (12)), Magermilch (z.B. (9)) und auch Vollmilch (z.B. (27)) verwendet. Für die Erhitzungsversuche wurden 1,5-ml Eppendorfreaktionsgefäße (z.B. (8, 41)), versiegelbare Ampullen mit 1,5-2 ml Phagensuspension (9, 21) oder 25-ml Schraubverschlussröhrchen (45, 46) verwendet. In einigen Studien wurden auch die Suspensionsmedien erst auf die Testtemperatur erwärmt, bevor die Phagen dazugegeben wurden (12, 46).

Während in den älteren Veröffentlichungen nur wenige taxonomisch nicht charakterisierte Phagenisolate erhitzt wurden, haben wir in unseren Untersuchungen zum ersten Mal repräsentative Phagen aller verfügbaren *L. lactis* Phagenspecies geprüft. Phageninfektionen werden in den Molkereien meist von Vertretern der 936-, c2-, und P335-Phagen hervorgerufen (16, 20, 31). Unsere Untersuchungen haben bestätigt, dass einige P335-Phagen und insbesondere einige 936-Phagen eine hohe Thermostabilität aufweisen. Sie werden daher nicht bei der üblichen Pasteurisierung der Rohmilch abgetötet. Madera *et al.* (27) konnten kürzlich zeigen, dass in der Rohmilch c2-Phagen dominierten, während in den Molkenproben der Betriebe vorwiegend 936-Phagen zu finden waren. Allerdings fand man auch in der Population von 936-Betriebsphagen sowohl hitzestabile als auch hitzeempfindliche Phagen nach einer Erhitzung auf 80°C für 5 min (36). Kürzlich wurde auch gezeigt, dass *L. lactis* Phagen, die aus Rohmilch isoliert worden waren, eine 5-min Erhitzung auf 90°C überlebten (8).

Die breite Spanne der für die Inaktivierung der *L. lactis* Phagen notwendigen Temperaturen wird in Abb. 2 illustriert.

#### *Ln. mesenteroides* Phagen

*Leuconostoc*-Starterkulturen sind Bestandteil von komplexen mesophilen definierten oder undefinierten Mehrstamm- oder Vielstamm-Starterkulturen, stellen dort aber die Minorkomponente dar (1-10 %) (14). *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* Stämme sind dabei die wichtigsten Fermentationsstämme. Sie setzen das Citrat der Milch um, wobei wichtige Aromastoffe (Diacetyl, Acetoin u.a.) und CO<sub>2</sub> gebildet werden. *Ln. mesenteroides* Phagen sind bisher nur in wenigen Publikationen beschrieben worden, obwohl sie – wenn sie phagensensible Wirtsstämme infizieren – die organoleptischen Eigenschaften der fermentierten Milchprodukte verschlechtern. Die Gegenwart virulenter *Leuconostoc*-

Phagen in Molkereien wurde bisher nur in wenigen Studien bestätigt, z.B. auch in einer deutschen Käseemilch (37). Seitdem wurden die *Leuconostoc*-Phagen vernachlässigt, obwohl die Bedeutung der *Leuconostoc*-Stämme in Starterkulturen deutlich zugenommen hat.

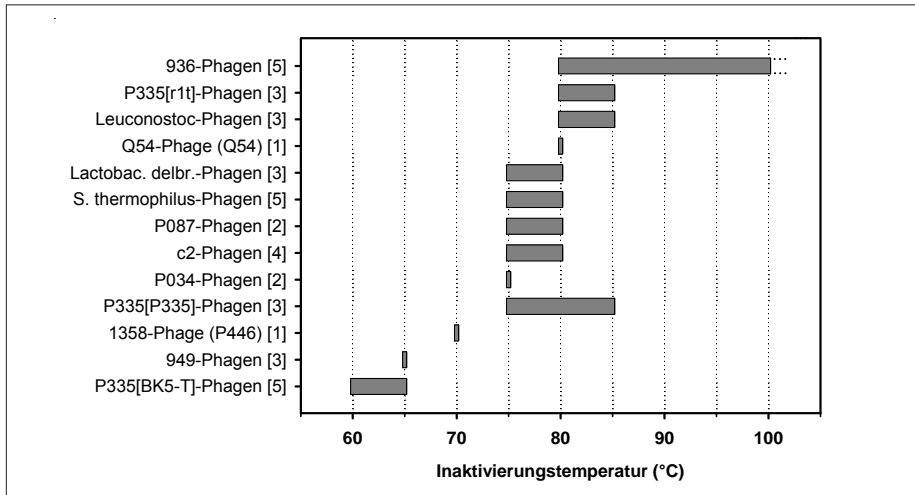


Abb. 2: Zusammenfassende Darstellung der Temperaturspannen zur vollständigen Inaktivierung der Phagen mesophiler (*L. lactis*, *Ln. mesenteroides*) und thermophiler (*S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* und subsp. *lactis*) Milchsäurebakterien in Magermilch (1-min Heißhaltezeit). Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der untersuchten Phagenisolate an.

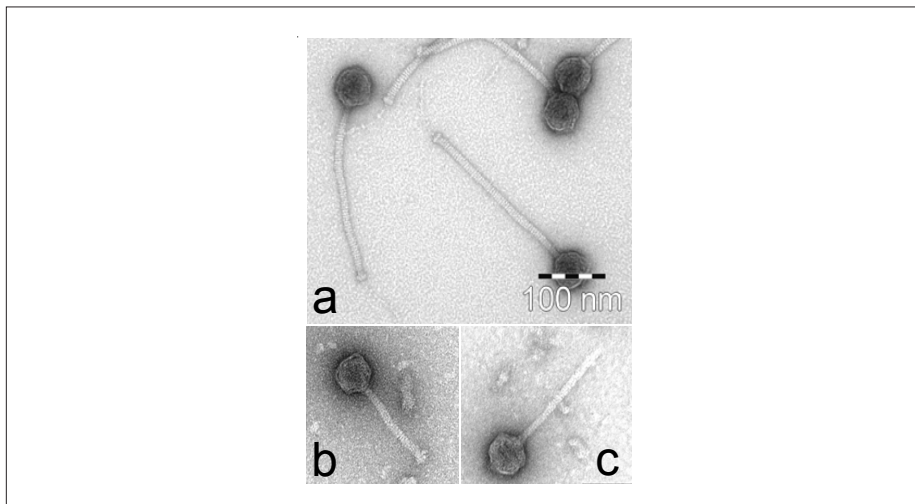


Abb. 3: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen repräsentativer *Siphoviridae* Phagen für *S. thermophilus* (Phage P53 [a]), *Ln. mesenteroides* (Phage P4556 [b]) und *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Phage PC658 [c]). Die Phagen weisen isodiametrische Köpfe und flexible, nicht-kontraktile Schwänze unterschiedlicher Länge auf (Phage P4556: 130 nm, Phage PC658: 170 nm, Phage P53: 240 nm).



Für das Hitzescreening standen 3 *Ln. mesenteroides* Phagenlysate zur Verfügung, die die gleiche Morphologie aufwiesen (gezeigt für den Phagen P4556 in Abb. 3) und genetisch eng verwandt waren (Daten nicht gezeigt). Die Phagen waren erst nach einer 1-min Erhitzung bei 80°C (1 Phage) - 85°C (2 Phagen) nicht mehr nachweisbar (Tab. 1). Bemerkenswert war hierbei allerdings die verminderte Thermostabilität aller *Leuconostoc*-Phagen im Suspensionsmedium Wasser. Hier wurden die Phagen nach 1 min schon bei niedrigen Temperaturen von 70-75°C inaktiviert. Somit zeigten die Phagen dieser mesophilen Aromakulturen eine erhöhte Thermoresistenz im Vergleich zu vielen Phagen der mesophilen Laktokokken (Tabelle 1, Abb. 2). Diese Eigenschaft der *Leuconostoc*-Phagen korrelierte gut mit der aus der Literatur bekannten ungewöhnlichen Thermoresistenz von *Leuconostoc*-Wildstämmen, die daher selbst in der pasteurisierten Milch nachgewiesen werden konnten (29).

#### *S. thermophilus* Phagen

Die bisher beschriebenen *S. thermophilus* Phagen weisen die gleiche Morphologie wie *L. lactis* P335-Phagen des BK5-T-Typs auf (Abb. 1, Abb. 3) und besitzen einige Strukturproteine, die denen der P335-[BK5-T]-Phagen sehr ähnlich sind. Deshalb sind sie – wie wir kürzlich publiziert haben – sogar in der Lage, an Laktokokkenzellen zu adsorbieren und ihre DNA in die wirtsfremden Zellen zu injizieren (2). Alle *S. thermophilus* Phagen sind miteinander genetisch verwandt, lassen sich aber in 2 Unterklassen untergliedern, die unterschiedliche Phagenstrukturproteine aufweisen (24, 38). Die Phagen beider Untergruppen unterscheiden sich weiterhin in ihrem DNA-Verpackungsmechanismus und werden demzufolge als *cos*-Phagengruppe (Phagen-DNA mit kohäsiven Enden) und *pac*-Phagengruppe (Phagen, die ihre DNA nach dem „Head-Full“-Prinzip verpacken) bezeichnet (24, 38). Trotz ihrer hohen Ähnlichkeit mit den P335-[BK5-T]-Phagen unterschieden sich die 5 untersuchten *S. thermophilus*-Phagen deutlich in ihrer Thermoresistenz von den Laktokokkenphagen: Während die P335-[BK5-T] Phagen bereits bei 65°C inaktiviert wurden (Tabelle 1, Abb. 2), war zur Inaktivierung der thermophilen *S. thermophilus* Phagen eine deutlich höhere Temperatur von 75-80°C erforderlich (Tabelle 2, Abb. 2). Die höhere Thermostabilität der *S. thermophilus* Phagen im Vergleich zu den P335-[BK5-T] Phagen kann vermutlich als Adaption an die höheren Fermentationstemperaturen der thermophilen Kulturen gedeutet werden. Obwohl *S. thermophilus*-Phagen des *cos*- und *pac*-Typs unterschiedliche Strukturproteine aufweisen (24, 38), wurden sie bei den gleichen Temperaturbedingungen inaktiviert (Tabelle 2).

Binetti und Reinheimer (3) zeigten für 5 argentinische *S. thermophilus* Phagen, dass auch diese – unabhängig vom Suspensionsmedium – bei ähnlichen Temperatur- und Zeitbedingungen inaktiviert wurden. Die Autoren schlussfolgerten, dass *S. thermophilus*-Phagen zuverlässig bei 90 °C (5 min) inaktiviert werden.

#### *Lb. delbrueckii* Phagen

Viele Phagen thermophiler *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* und *bulgaricus* Starterkulturen sind nah verwandt und können sogar Stämme beider Subspecies infizieren (30). Zwei *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Phagenlysate wurden zusammen mit dem aus der Literatur bekannten und gut charakterisierten *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Referenzphagen LL-H (33) auf ihre Hitzestabilität hin überprüft. Diese isodiametrischen *Siphoviridae* Phagen wiesen die gleiche Morphologie auf, die in Abb. 3 für den Phagen PC658 gezeigt wird.

Die vollständige Inaktivierung der Phagen in Magermilch erfolgte bei einer 1-min Erhitzung auf 75-80°C (Tabelle 2, Abb. 2). Somit zeigten diese Phagen die gleiche Thermostabilität wie die Phagen der thermophilen *S. thermophilus* Starterkulturen



(Abb. 2). Allerdings erwiesen sich die *Lb. delbrueckii* Phagen in Wasser als instabil. Bereits nach dem Resuspendieren der Phagen in Wasser wurde der Phagentiter um eine log-Stufe reduziert. Bei der Erhitzung im Suspensionsmedium Wasser war bereits eine 65°C-Erhitzung zur vollständigen Inaktivierung ausreichend (Tabelle 2).

**Tab. 2: Thermische Inaktivierung der Phagen thermophiler Milchsäurebakterien (*Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* und subsp. *bulgaricus*) in Magermilch und Wasser nach einer Heißhaltezeit von 1 min. Die Phagen wurden in hohen Titern erhitzt. Der Buchstabencode zeigt an, dass Phagen nach der Erhitzung noch in Milch (M) oder in Wasser (H) im Plaquetest nachzuweisen waren. Die kritische Temperatur zur vollständigen Inaktivierung ist mit „-“ Symbolen angegeben und schwarz unterlegt (Nachweisgrenze: 2 Plaquetbildende Einheiten pro ml).**

<i>S. thermophilus</i>				Inaktivierungstemperatur [°C]										
Phagen-typ	Phage	Ref.	max. Titer [PbE/ml]	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
<i>cos</i>	P53	[2]	1x10 <sup>6</sup>	..	..	MH	MH	MH	..	..	..	..	..	
<i>cos</i>	PC1014	CP2	2x10 <sup>7</sup>	..	..	MH	MH	MH	..	..	..	..	..	
<i>cos</i>	PC572	CP2	3x10 <sup>10</sup>	..	..	MH	MH	..	..	..	..	..	..	
<i>cos</i>	PC254	CP2	2x10 <sup>7</sup>	..	..	MH	MH	MH	..	..	..	..	..	
<i>pac</i>	P8	[38]	2x10 <sup>6</sup>	..	..	MH	MH	-H	-	..	..	..	..	

<i>Lb. delbrueckii</i>				Inaktivierungstemperatur [°C]										
subspecies	Phage	Ref.	max. Titer [PbE/ml]	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
<i>lactis</i>	LL-H	[33]	2x10 <sup>6</sup>	..	..	M-	M-	-	..	..	..	..	..	
<i>bulgaricus</i>	P1508	CP1	2x10 <sup>6</sup>	..	..	M-	M-	M-	..	..	..	..	..	
<i>bulgaricus</i>	PC6588 <sup>a</sup>	CP2	1x10 <sup>5</sup>	..	..	M.	M.	-	..	..	..	..	..	

MH Phagen nach 1-min Erhitzung in Magermilch (M) und Wasser (H) im Plaquetest nachweisbar.

M- Phagen nur noch in Magermilch (M) nachweisbar.

-H Phagen nur noch in Wasser (W) nachweisbar.

- Phagen weder in Magermilch noch in Wasser nachweisbar (Nachweisgrenze: 2 PbE/ml).

.. Keine Erhitzung durchgeführt.

<sup>a</sup> Der *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Phage CHPC658 wurde nur in Milch erhitzt.

MBT: Institutspagensammlung: CP1 / CP2: Phagen der Kulturenhersteller 1 und 2

PbE: Plaquetbildende Einheiten

In der Literatur wurde der *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Phage Ib<sub>3</sub> als extrem hitzeresistent beschrieben (40), so dass zur Inaktivierung in Milch eine Erhitzung auf 90°C für 15 min durchgeführt werden musste. Der schützende Effekt der Milch scheint für diese Phagen sehr ausgeprägt zu sein, da die Phagen in anderen Medien (Salzpuffersystem, komplexes Wachstumsmedium) bereits nach 5 min abgetötet wurden (40).

#### 4. Schlussfolgerungen

Durch unsere breit gefächerte Studie ist es erstmalig möglich, die Thermostabilität der Phagen der Starterkulturen mit der taxonomische Eingruppierung der Phagen zu korrelieren. Eine Temperatur von 75-80°C (1 min Heißhaltezeit) war sowohl für viele Phagen der mesophilen *L. lactis* Kulturen als auch für die Phagen thermophiler *S. thermophilus* und *Lb. delbrueckii* Kulturen zur kompletten Inaktivierung ausreichend. Diese Erhitzungsbedingungen waren somit bereits deutlich schärfer als die einer üblichen Standardpasteurisierung von 72-75°C (20-40 s). Deutlich höhere Inaktivierungstemperaturen

waren allerdings bei einigen *L. lactis*-Phagen (P335 und 936-Phagen) und den *Leuconostoc*-Phagen notwendig. Sehr große Variabilitäten hinsichtlich der Inaktivierungstemperatur wiesen Laktokokkenphagen der 936 und der P335 Phagenspecies auf.

## 5. Literatur

- (1) Adams, M. H.: Bacteriophages. Interscience, New York (1959)
- (2) Ammann, A., Neve, H., Geis, A., Heller, K.J.: Plasmid transfer via transduction from *Streptococcus thermophilus* to *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* **190** 3083-3087 (2008)
- (3) Binetti, A.G., Reinheimer, J.A.: Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. *Journal of Food Protection* **63** 509-515 (2000)
- (4) Braun, V., Hertwig, S., Neve, H., Geis, A., Teuber, M.: Taxonomic differentiation of bacteriophages of *Lactococcus lactis* by electron microscopy, DNA-DNA hybridization, and protein profiles. *Journal of General Microbiology* **135** 2551-2560 (1989)
- (5) Breitbart, M., Rohwer, F.: Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology* **13** 278-284 (2005)
- (6) Bruttin, A., Desiere, F., d'Amico, N., Guérin, J.-P., Sidoti, J., Huni, B., Lucchini, S., Brüssow, H.: Molecular ecology of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage infections in a cheese factory. *Applied and Environmental Microbiology* **63** 3144-3150 (1997)
- (7) Brondsted, L., Ostergaard, S., Pedersen, M., Hammer, K., and Vogensen, F.K.: Analysis of the complete DNA sequence of the temperate bacteriophage TP901-1: Evolution, structure, and genome organization of lactococcal bacteriophages. *Virology* **283** 93-109 (2001)
- (8) Buzrul, S., Öztürk, P., Alpas, H., Akcelik, M.: Thermal and chemical inactivation of lactococcal bacteriophages. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie - Food Science and Technology* **40** 1671-1677 (2007)
- (9) Chopin, M.C.: Resistance of 17 mesophilic lactic *Streptococcus* bacteriophages to pasteurization and spray-drying. *Journal of Dairy Research* **47** 131-139 (1980)
- (10) Chopin, A., Bolotin, A., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., Chopin, M.-C.: Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucleic Acids Research* **29** 644-651 (2001)
- (11) Chopin, A., Deveau, H., Ehrlich, S.D., Moineau, S., Chopin, M.-C.: KSY1, a lactococcal phage with a T7-like transcription. *Virology* **365** 1-9 (2007)
- (12) Daoust, D. R., El-Bisi, H. M., Litsky, W.: Thermal destruction kinetics of a lactic streptococcal bacteriophage. *Applied Microbiology* **13** 478-485 (1965)
- (13) De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E.: A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* **23** 130-135 (1960)
- (14) Dessart, S.R., Steenson, L.R.: Biotechnology of dairy *Leuconostoc*. In: *Food biotechnology. Microorganisms*. Hui, Y.H., Khachatourians, G.G. (Eds), pp. 665-702, VCH Publishers Inc (1995)
- (15) Deveau, H., Labrie, S. J., Chopin, M. C., Moineau, S.: Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Applied Environmental Microbiology* **72** 4338-4346 (2006)
- (16) Emond, E., Moineau, S.: Bacteriophages and food fermentations. In: *Bacteriophage – genetics and molecular biology* (pp. 93-123) Caister Academic Press, Norfolk, UK (2007)
- (17) Fortier, L.-C., Bransi, A., Moineau, S.: Genome sequence and global gene expression of Q54, a new phage species linking the 936 and c2 phage species of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* **188** 6101-6114 (2006)
- (18) Garneau, J.E., Tremblay, D.M., Moineau, S.: Characterization of 1706, a virulent phage from *Lactococcus lactis* with similarities to prophages from other *Firmicutes*. *Virology* **373** 298-309 (2008)
- (19) Jarvis, A.W.: Differentiation of lactic streptococcal phages into phage species by DNA-DNA homology. *Applied and Environmental Microbiology* **47** 343-349 (1984)
- (20) Josephsen, J., Neve, H.: Bacteriophage and antiphage mechanisms of lactic acid bacteria. In: S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects*, (3rd ed) (pp. 295-350) Marcel Dekker, New York, USA (2004)

- (21) Koka, M., Mikolajc, E.M.: Kinetics of thermal destruction of bacteriophages active against *Streptococcus lactis*. *Journal of Dairy Science* **50** 1025-1031 (1967)
- (22) Krusch, U., Neve, H., Luschei, B., Teuber, M.: Characterization of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by host specificity and electron microscopy. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **39** (3) 155-167 (1987)
- (23) Labrie, S.L., Josephsen, J., Neve, H., Vogensen, F.K., Moineau, S.: Morphology, genome sequence, and structural proteome of type phage P335 from *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **74** 4636-4644 (2008)
- (24) Le Marrec, C., van Sinderen, D., Walsh, L., Stanley, E., Vlegels, E., Moineau, S., Heinze, P., Fitzgerald, G., Fayard, B.: Two groups of bacteriophages infecting *Streptococcus thermophilus* can be distinguished on the basis of model of packaging and genetic determinants for major structural proteins. *Applied and Environmental Microbiology* **63** 3246-3253 (1997)
- (25) Lillehaug, D.: An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology* **83** 85-90 (1997)
- (26) Loof, M., Lembke, J., Teuber, M.: Characterization of the genome of the *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* bacteriophage P008 wide-spread in German cheese factories. *Systematic and Applied Microbiology* **4** 413-423 (1983)
- (27) Madera, C., Monjardin, C., Suárez, J.E.: Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Applied and Environmental Microbiology* **70** 7365-7371 (2004)
- (28) Mahanivong, C., Boyce, J.D., Davidson, B.E., Hillier, A.J.: Sequence analysis and molecular characterization of the *Lactococcus lactis* temperate bacteriophage BK5-T. *Applied and Environmental Microbiology* **67** 3564-3576 (2001)
- (29) Martley, F.G., Crow, V.L.: Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *International Dairy Journal* **3** 461-483 (1993)
- (30) Mata, M., Trautwetter, A., Luthaud, G., Ritzenthaler, P.: Thirteen virulent and temperate bacteriophages of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis* belong to a single DNA homology group. *Applied and Environmental Microbiology* **52** 812-818 (1986)
- (31) Mc Grath, S., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D.: Bacteriophages in dairy products: pros and cons. *Biotechnology Journal* **2** 450-455 (2007)
- (32) Mc Intyre, K., Heap, H.A., Davey, G.P., Limsowtin, K.Y.: The distribution of lactococcal bacteriophage in the environment of a cheese manufacturing plant. *International Dairy Journal* **1**, 183-197 (1991)
- (33) Mikkonen, M., Raisanen, L., Alatossava, T.: The early gene region completes the nucleotide sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* phage LL-H. *Gene* **175** 49-57 (1996)
- (34) Müller-Merbach, M., Neve, H., Hinrichs, J.: Kinetics of the thermal inactivation of the *Lactococcus lactis* bacteriophage P008. *Journal of Dairy Research* **72** 281-286 (2005)
- (35) Müller-Merbach, M., Rauscher, T., Hinrichs, J.: Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. *International Dairy Journal* **15** 777-784 (2005)
- (36) Müller-Merbach, M., Hinrichs, J.: Thermische und hydrostatische Inaktivierung von Bakteriophagen. *Chemie Ingenieur Technik* **78** 1723-1730 (2006)
- (37) Neve, H., Lilischkis, R., Teuber, M.: Characterization of a virulent bacteriophage of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **40** 205-212 (1988)
- (38) Neve, H., Krusch, U., Teuber, M.: Classification of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* isolated from yogurt and Swiss-type cheese. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30** 624-629 (1989)
- (39) Neve, H., Laborius, A., Heller, K.J.: Renaissance alter Phagentypen? *Deutsche Molkerei Zeitung* **15** 25-29 (2004)
- (40) Quiberoni, A., Guglielmotti, D.M., Reinheimer, J.A.: Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. *International Journal of Food Microbiology* **84** 51-62 (2003)
- (41) Suarez, V.B., Reinheimer, J.A.: Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian *Lactococcus lactis* phages. *Journal of Food Protection* **65** 1756-1759 (2002)

- (42) Sun, X., Heller, K.J., Neve, H.: The *ltp* gene of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 encodes a lipoprotein which is expressed during lysogeny. *Virology* **350** 146-157 (2006)
- (43) Terzaghi, B. E., Sandine, W. E.: Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology* **29** 807-813 (1975)
- (44) Van Sinderen, D., Karsens, H., Kok, J., Terpstra, P., Ruiters, M. H. J., Venema, G., Nauta, A.: Sequence analysis and molecular characterization of the temperate lactococcal bacteriophage r1t. *Molecular Microbiology* **19** 1343-1355 (1996)
- (45) Wilkowske, H.H., Nelson, F.E., Parmelee, C.E.: Heat inactivation of bacteriophage strains active against lactic streptococci. *Applied Microbiology* **2** 250-253 (1954)
- (46) Zottola, E.A., Marth, E.H.: Thermal inactivation of bacteriophages active against lactic streptococci. *Journal of Dairy Science* **49** 1338-1342 (1966)

### Danksagung

Für die technische Assistenz danken wir Inka Lammertz, Angela Back und Anika Petrowsky. Ein herzlicher Dank geht auch an Herrn Yahya Ali für die Differenzierung der *S. thermophilus* Phagen mit einer unveröffentlichten Multiplex-PCR Methode.

Den Starterkulturenherstellern danken wir für die Übersendung von Phagenproben und Frau Dr. A. Budde-Niekiefel und Herrn Dr. T. Janzen für die Diskussionsbeiträge.

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) via AiF über den Forschungsbereich der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert (AiF-Projekt 14339 N). Für die Zusammenarbeit danken wir Herrn Prof. Dr.-Ing. J. Hinrichs, Frau Dr. M. Müller-Merbach und Frau Z. Atamer (Univ. Hohenheim).

### 6. Zusammenfassung

Dietrich, J., Neve, H., Heller, K.J.: **Hitzeresistenz von Bakteriophagen mesophiler und thermophiler Milchsäurebakterien.** *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **59** (4) 285-298 (2007)

#### 26 Mikrobiologie (Bakteriophagen, Hitzeresistenz)

Bakteriophagen führen in Molkereien zu Säuerungsstörungen, indem sie die bakterielle Starterkultur infizieren und lysieren. Weit verbreitet sind insbesondere Phagen für *Lactococcus lactis* und *Streptococcus thermophilus*. Phagen in der Rohmilch stellen eine Hauptinfektionsquelle da, sofern sie die thermische Behandlung (Pasteurisierung) der Milch überleben. In dieser Arbeit wurden insgesamt 40 Phagen für mesophile Starterkulturen (29 *L. lactis* und 3 *Leuconostoc mesenteroides* Phagen) und für thermophile Starterkulturen (3 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* und subsp. *lactis* Phagen, 5 *S. thermophilus* Phagen) in den beiden Suspensionsmedien Magermilch und Wasser erhitzt (1-min Heißhaltezeit), um die Thermostabilität der Phagen aus unterschiedlichen Phagenspecies zu erfassen. Das Screening der Phagenisolate ergab eine hohe Variabilität der Thermoresistenz der *L. lactis* Phagen: Vertreter der 949- und P335-Phagen des BK5-T-Typs wurden schon bei niedriger Temperatur (60-65°C) inaktiviert. Ähnlich empfindlich erwies sich ein Phage der 1358-Phagenspecies, der bei 70°C abgetötet wurde. Die Mehrzahl der *L. lactis* Phagen wurde allerdings erst bei 75-80°C inaktiviert (Isolate der Phagenspecies P034, c2, Q54, 936, P335, P087). Diese Temperaturspanne reichte auch zur Inaktivierung der Phagen der thermophilen Kulturen (*S. thermophilus*,

*Lb. delbrueckii*). Die *Leuconostoc*-Phagen hingegen wurden erst bei höheren Temperaturen von 80-85°C in Magermilch vollständig abgetötet. Einige P335- und einige 936-Phagen wiesen eine bemerkenswert hohe Variabilität hinsichtlich ihrer Inaktivierungstemperatur auf und wurden erst bei höheren Temperaturen von 85°C (hitze stabile P335-Phagen) oder sogar erst bei 95-100°C (hitze stabile 936-Phagen) inaktiviert.

## Summary

Dietrich, J., Neve, H., Heller, K.J.: **Heat resistance of bacteriophages of mesophilic and thermophilic lactic bacteria.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **59** (4) 285-298 (2007)

### 26 Microbiology (Bacteriophages, heat resistance)

In dairies, bacteriophages cause delays or failures of fermentation activities when they infect and lyse the bacterial starter cultures. The most abundant viruses are phages of *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus*. Phages in raw milk that survive the thermal treatment of milk (i.e., pasteurisation) represent the main infection source. In this study, a total number of 40 phages infecting mesophilic starter cultures (29 *L. lactis* and 3 *Leuconostoc mesenteroides* phages) and thermophilic starter cultures (3 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and subsp. *lactis* phages, 5 *S. thermophilus* phages) were heated in the two suspension media skim milk and water (1-min heat exposure) in order to assess the thermal stability of phages belonging to different phage species. The screening of the phages revealed a high variability of the *L. lactis* phages: Representatives of the 949- and P335 phages of the BK5-T subgroup were highly temperature sensitive and were inactivated at temperatures of as low as 60-65°C. One phage of the 1358 phage species showed a similar heat sensitivity and did not survive a heating at 70°C. However, the majority of the *L. lactis* phages was inactivated at temperatures of 75-8°C (phage isolates of the phage species P034, c2, Q54, 936, P335, P087). This temperature range was also sufficient to inactivate all phages of the thermophilic cultures (*S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii*). In contrast, *Leuconostoc* phages required a higher temperature of 80-85°C for complete inactivation. A set of P335- and 936-phages exhibited a remarkable variability with respect to their inactivation temperature and required temperatures as high as 85°C (heat-stable P335 phages) or 95-100°C (heat-stable 936 phages) for complete inactivation.

## Résumé

Dietrich, J., Neve, H., Heller, K.J.: **Résistance thermique des bactériophages de bactéries lactiques mésophiles et thermophiles.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **59** (4) 285-298 (2007)

### 26 Microbiologie (Bactériophages, résistance thermique)

Dans les laiteries, des bactériophages sont à l'origine de perturbations de fermentation en infectant et en lysant les cultures de levain bactériennes. En particulier des phages pour *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus* sont très répandus. Des phages dans le lait cru sont une source d'infection principale, pour autant qu'ils survivent au traitement thermique (pasteurisation) du lait. Dans cette étude, 40 phages pour des

cultures de levain mésophiles (29 phages *L. lactis* et 3 phages *Leuconostoc mesenteroides*), et pour des cultures de levain thermophiles (3 phages *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et subsp. *lactis*, 5 phages *S. thermophilus*) ont été chauffés dans les deux milieux de suspension lait écrémé et eau (1-min durée de chambrage) pour mesurer la stabilité des phages provenant d'espèces de phages différentes. Le screening des isolats de phage a révélé une variabilité élevée de la résistance thermique des phages *L. lactis*: des représentants des phages P335 et du type 949 et Bk5-T ont déjà été inactivés à une température basse (60-65°C). Le phage de l'espèce 1358, inactivé à 70°C, s'est montré pareillement sensible. La majorité des phages *L. lactis* a toutefois été inactivée seulement à 75-80°C (isolats des espèces de phage P034, c2, Q54, 936, P335, P087). Cette marge de température a également suffi pour inactiver les phages des cultures thermophiles (*S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii*). Par contre les phages *Leuconostoc* n'ont été inactivés complètement qu'à des températures plus élevées de 80-85°C dans le lait écrémé. Certains phages 936 et P335 ont démontré une variabilité remarquablement élevée en ce qui concerne leur température d'inactivation, et ont seulement été inactivés à des températures au-dessus de 85°C (phages P335 thermostables) ou de 95-100°C (phages 936 thermostables).