

# Elektronenmikroskopische Darstellung von Phagen der thermophilen Milchsäurebakterien in Hartkäseereien\*

U. F. Kunz, J. L. Kurmann und M. Rüegg  
Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft  
CH - 3097 Liebefeld/Bern

Eingereicht am 7. März 1983

Aus verschiedenen Stufen der Käseproduktion und -reifung konnten in zwei Hartkäseereien drei morphologisch ähnliche Phagentypen (zwei aktiv gegen Laktobazillen, einer gegen Streptokokken) elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Die Isolate wiesen verschiedene Dimensionen betreffend Kopfdurchmesser [im Bereich von 64 bis 76 nm] und Schwanzlänge [von 258 bis 386 nm] auf. Alle Typen zeigten eine isometrische Kopfform, nicht-kontraktile, quergestreifte und flexible Schwänze mit oder ohne eindeutig nachweisbarer Endplatte und konnten dem Typ B nach BRADLEY (5), Subtyp B1 nach ACKERMANN et al. (4) zugeordnet werden.

Die beschriebenen Phagen konnten in Gärproben, Labgärmoiken, Ausrührsirtten, ein- und 150-tägigen Käseproben sowie selten in der erhitzten Rückgabemoike gefunden werden.

Ein unterschiedlicher temperenter Phagentyp mit prolatern Kopf [132×51 nm] und grobsegmentiertem Schwanz [Länge 282 nm] wurde nach Induktion von lysogenen Laktobazillus lactis-Reinstämmen nachgewiesen. Dieses Isolat konnte dem Subtyp B3 nach ACKERMANN et al. (4) zugeteilt werden. Neben intakten und teilweise instabilen Phagen wurden in einzelnen Filtraten auch extrem lange Schwänze [Typ «Polytail»; länger als 600 nm] und riesige ovale Kopfformen variabler Gestalt [Typ «Monster»; länger als 300 nm] gefunden.

## 1. Einleitung

Phagen von thermophilen Milchsäurebakterien sind von REDDY (12) und SOZZI et al. (15), (16) isoliert und studiert worden, wobei diese Autoren feststellen konnten, dass solche Phagen weit häufiger als erwartet in Käseereien auftreten. Trotz dieser Tatsache sind bis jetzt nur relativ wenig morphologische Untersuchungen über diese Phagen durchgeführt worden. Die wichtigsten Publikationen darüber stammen von ACCOLAS et al. (1), (2) und von REINBOLD et al. (13). Beide Autorengruppen beschrieben sowohl Phagen der thermophilen Laktobazillen als auch der thermophilen Streptokokken:

- Die Phagen von *Streptokokkus thermophilus* gehören generell einem morphologischen Typ an mit isometrischem Kopf und nicht-kontraktilen Schwanz mit je nach Isolat unterschiedlichen Dimensionen.
- Bei den beiden *Laktobazillus*-Arten *bulgaricus* und *lactis* ist derselbe Typ wie bei a) zu finden. Daneben treten bei *Laktobazillus bulgaricus* auch Phagen mit zusätzlicher kontraktiler Scheide auf.
- Phagen der *Laktobazillus helveticus*-Art sind vom gleichen Typ wie a), besitzen aber immer eine kontraktile Scheide.

Die vorliegende Arbeit zielt darauf ab, die in verschiedenen Stufen der Emmentalerproduktion und -reifung auftretenden Phagen elektronenmikroskopisch zu erfassen und morphologisch zu charakterisieren. Es sollen die Isolate aus zwei Hartkäseereien verglichen werden, wobei in beiden Betrieben verschiedene thermophile Milchsäurebakterien als Starterkulturen zeitlich gestaffelt zum Einsatz gelangten.

## 2. Experimenteller Teil

### 2.1 Käseereiprüfungen und Milchsäurebakterienkulturen

In beiden Hartkäseereien wurden während mehrerer Wochen folgende Proben entnommen: Betriebskulturen, Gärproben, Labgärmoiken, Ausrührsirtten, Schotten (Moiken), ein- und 150-tägige Käseproben.

Die jeweils eingesetzten thermophilen Starterkulturen waren:

**Käseerei A:** Die Rohmischkulturen RMK 101, 157, 183, 184, 186 und 302; Laktobazillen-Reinstämme aus RMK 101 zusammen mit dem Streptokokken-Standardgemisch abf.

**Käseerei B:** RMK 101 und 302

### 2.2 Medien

Als Nährmedien wurden bei RMK rekonstituierte Pulvermagermilch und bei Reinstämmen Hefemilch eingesetzt.

### 2.3 Sterilfiltrat-Herstellung

Die Zentrifugation der Probe (wenn nötig mit Milchsäure angesäuert) erfolgte bei 4000 g während 15 Min. Der Überstand wurde mit Millex HA (Millipore, Porenweite 0,45 µm) zur Eliminierung der Bakterien sterilfiltriert.

Die Käseproben wurden folgendermassen aufgearbeitet: Aufbrechen und an verschiedenen Stellen total 1 g entnehmen, mit 1 ml Na-Zitrat (20%) und 8 ml Peptonschotte versetzen und anschliessend in einem Colworth Stomacher 80 während 2 Min. aufschliessen. Die darauffolgende Sterilfiltration war wegen des Fettanteiles des Käses mit Schwierigkeiten verbunden.

### 2.4 Säuerungsaktivitätstest

Zur Feststellung einer Phagenaktivität des Filtrates gegen die Milchsäurebakterien wurde ein Aktivitätstest durchgeführt. Der Test erfolgte entweder in Pulvermagermilch oder in Hefe-

\* Die vorliegende Publikation stellt einen Auszug aus der Dissertation dar:

KUNZ, U.F.: «Nachweis von Phagen der Milchsäurebakterien, speziell in Hartkäseereien», Diss. Uni Bern (1982)

milch. Die Impfmenge der Kultur betrug 1‰, die Filtratkonzentration reichte von 10<sup>-4</sup> bis 10<sup>-6</sup>. Als Kontrollen wurden eine Probe mit vorher pasteurisierter Filtratverdünnung (90 °C, 5 Min.) und eine Probe ohne Filtratzusatz mitgeführt. Die Proben wurden in einem Kurventhermostat (bei simulierten Emmentaler-Fabrikationstemperaturen) während 17 bis 20 Std. inkubiert. Die aufgrund von Säuregrad (°SH)- und pH-Werten sowie des mikroskopischen Bildes als phagenverdächtig bezeichneten Proben wurden für den direkten Phagennachweis im Elektronenmikroskop weiterbehandelt. Zur Titersteigerung waren noch weitere Passagen mit erneuter Filtratherstellung nötig. Dabei wurde jeweils die höchste noch phagenpositive Verdünnung verwendet. Der Phagentiter in den Lysaten musste mindestens 10<sup>6</sup>/ml betragen, damit die Partikel im Elektronenmikroskop leicht nachweisbar waren.

## 2.5 Elektronenmikroskopie

Die Schritte der Aufarbeitung richteten sich nach dem erreichten Titer des Filtrates:

Titer ≥ 10<sup>6</sup>/ml: Filtrat direkt für die Negativkontrastierung verwenden

Titer < 10<sup>6</sup>/ml: Phagen anreichern durch

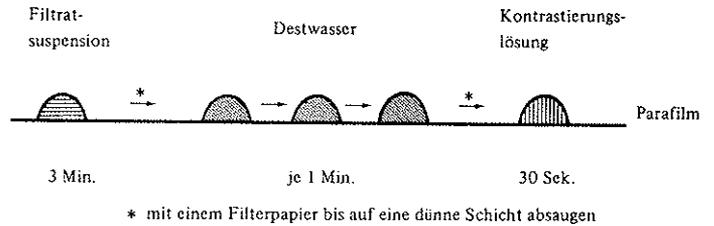
— Polyethylenglykol-Behandlung (PEG 6000, Serva 33137) nach YAMAMOTO et al. (18)

oder durch

— Ultrazentrifugation 162 000 g während 150 Min., aufnehmen des Sediments in 0,1 M Ammoniumazetat über Nacht bei 5 °C; evtl. anschließende Dialyse gegen denselben Puffer

## Negativkontrastierung

Als Kontrastierungslösungen dienten eine 2%ige Phosphorwolframsäure oder 2%iges Uranylazetat. Der Zusatz von 0,05% α-Lactalbumin erhöhte die Benetzbarkeit auf dem Trägernetzchen. Die Lösungen wurden in Destwasser hergestellt, bei 3000 g für 5 Min. zentrifugiert und der pH-Wert dem der Phagenprobe angeglichen (4,5 bis 5). Die Negativkontrastierung wurde mit der Tropfenmethode als sukzessive Methode ausgeführt (14):



Als Träger verwendeten wir Kupfernetzchen (Elmis Int., Kat. Nr. 0400, Maschenweite 400, Durchmesser 3,05 mm, im Hochvakuum kohlebedampft und danach einer Glimmentladung ausgesetzt), wobei zuerst das phagenhaltige Filtrat aufgebracht, nach mindestens 3 Min. Adsorptionszeit abgesaugt, gewaschen und dann während 30 Sek. negativkontrastiert wurde.

## Filme und Elektronenmikroskope

Für die photographischen Arbeiten standen zur Verfügung:

— Planfilm (Electron Microscope Film Nr. 4489, 8,3×10,2 cm) beim Zeiss EM 10

— Photoplatten (Kodak EM-Photoplatten, 8,3×10,2 cm) beim Philips EM 300

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der Phagenmorphologie und Einteilung der verschiedenen Isolate

Käserei/ Abb. Nr.	Phagen isoliert aus	Phagen aktiv gegen	Morphologie		Dimensionen (nm)		Einteilung	
			Phagenkopf	Phagenschwanz	Kopf	Schwanz	Typ*	Subtyp**
A (Säuerungs- störung)/ 1a + 1b	LGM, ARS	thermophile Sc. aus RMK 101	isometrisch	feine Querstreifung flexibel nicht-kontraktil evtl. schmale Endplatte	64	258	B	B1
A/2a + 2b	LGM, ARS, 1 t.- und 150 t.- Käse, (Schotte)	verschiedene Stämme ther- mophiler Lb. lactis	isometrisch (oft defekt)	feine Querstreifung flexibel nicht-kontraktil evtl. Endplatte	75 (69)	386	B	B1
			fehlt	Querstreifung flexibel nicht-kontraktil hohler axialer Kanal	—	> 600	Typ «Polytail»	
Induktion im Labor/ 4 + 5	verschiedene Stämme ther- mophiler Lb. lactis		prolat (selten defekt)	grobe Segmentie- rung, flexibel nicht-kontraktil	132 × 51 (112 × 49)	282	B	B3
			prolat	fehlt	> 300	—	Typ «Monster»	
A/3	LGM, ARS, Schotte, 1 t.- und 150 t. Käse	thermophile Lb. aus RMK 101 und RMK 157	vgl. A/2a + 2b		76 (68)	384	B	B1
					—	> 600	Typ «Polytail»	
B (Säuerungs- störung)/ 6a + 6b	GP, LGM, ARS	thermophile Lb. aus RMK 101 und RMK 302	isometrisch	feine Querstreifung flexibel nicht-kontraktil schmale Endplatte	64	274	B	B1

\* Einteilung nach BRADLEY (5)

\*\* Einteilung nach ACKERMANN et al. (4)

LGM = Labgärmolke      Sc. = Streptokokken  
ARS = Ausrührsirte      Lb. = Laktobazillen  
GP = Gärprobe          RMK = Rohmischkultur

## 2.6 Induktion der Laktobazillen

### Material und Methode

MRS-Bouillon als Nährmedium (6); Spektrophotometer Bausch & Lomb (Spectronic 20, Filter 540 nm) für Messungen der optischen Dichte (O. D.). Die MRS-Bouillon wurde je nach Stamm mit 10 bzw. 20‰ Frischkultur (16 Std. bei 38 °C inkubiert) beimpft und bis zu O. D. 0,1 bei 38 °C vorbebrütet.

### Mitomycinbehandlung

Zusatz von 0, 0,2, 2 und 5 µg Mitomycin C/ml zu jeder behandelten Probe.

### UV-Bestrahlung

Nach der Zentrifugation von je 10 ml MRS-Bouillon bei 5000 g während 15 Min. wurde das Sediment in 5 ml 0,1 M MgSO<sub>4</sub> dispergiert und in einer Glasschale während 10 bzw. 20 und 30 Sek. UV-bestrahlt. Der Abstand zur 15 W Philips UV-Lampe betrug 25 cm. Die Dispersion wurde alsdann mit 5 ml doppelt starker MRS-Bouillon vermischt und in der Dunkelheit bebrütet.

Die Bebrütung der Mitomycin- und UV-behandelten Proben erfolgte bei 30 bzw. 38 und 45 °C im Wasserbad.

## 3. Resultate

### 3.1 Zusammenfassung der isolierten Phagentypen

In **Tabelle 1** sind die aus den beiden Käsereien A und B während verschiedenen Wochen isolierten Phagen zusammenfassend beschrieben. Die Tabelle zeigt zudem, in welchen Stufen der Käseproduktion und -reifung die Phagen aufgetreten sind, welchem morphologischen Typ sie angehören und gegen welche Kulturen sie eine lytische Aktivität entwickelt haben.

### 3.2 Käserei A

Während der Herstellung von Emmentalerkäse sind in der Käserei A in verschiedenen Wochen zwei morphologisch ähnliche Phagentypen aufgetreten.

— Die bei der Fabrikation mit RMK 101 festgestellte Säuerungsstörung konnte auf die lytische Aktivität von Phagen gegen Streptokokken zurückgeführt werden. Von den entnommenen Proben erwiesen sich die Labgärmolke und die Ausrührsirte als phagenhaltig, wobei in beiden Filtraten der gleiche Phagentyp auftrat:

- Isometrische Kopfform [Durchmesser 64 nm] und langer flexibler und nicht-kontraktiler Schwanz [Länge 258 nm] mit feiner Querstreifung und evtl. schmaler Endplatte.

Wie die **Abbildungen 1a und 1b** zeigen, waren die Phagen bevorzugt in Rosetten angeordnet.

— Bei Fabrikationsversuchen mit definierten Mischkulturen, bestehend aus mehreren Stämmen von *Laktobazillus lactis* aus der RMK 101 sowie dem Streptokokken-Standardgemisch abf, sind aus verschiedenen Produktionsstufen (Labgärmolke, Ausrührsirte, Schotte, ein- und 150-tägige Käseprobe) Phagen von Laktobazillen isoliert und morphologisch charakterisiert worden:

- Isometrische Kopfform [Durchmesser 75 nm] und sehr langer flexibler, nicht-kontraktiler Schwanz [Länge 386 nm] mit feiner Querstreifung und möglicherweise einer Endplatte. Daneben waren gelegentlich extrem lange Schwänze vom Typ «Polytail» [länger als 600 nm] mit einer Querstreifung und einem hohlen axialen Kanal zu beobachten (**Abb. 2a und 2b**, siehe auch **Abb. 3**).

— Beim Einsatz von verschiedenen RMK in der gleichen Käserei wurden in zwei Fällen (RMK 101 und 157) ebenfalls die Laktobazillen von Phagen lysiert, wobei diese Aktivität in den gleichen Produktionsstufen wie bei den Versuchen mit den definierten Mischkulturen auftrat und der identische Phagentyp (wie in **Abb. 2a und 2b** dargestellt) nachgewiesen werden konnte (**Abb. 3**).

### 3.3 Induktion der Laktobazillen

Nach der Induktion der *Laktobazillus lactis*-Stämme aus RMK 101, die in der Käserei A eingesetzt wurden, konnten aus sämtlichen elf Reinstämmen temperente Phagen freigesetzt und elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden:

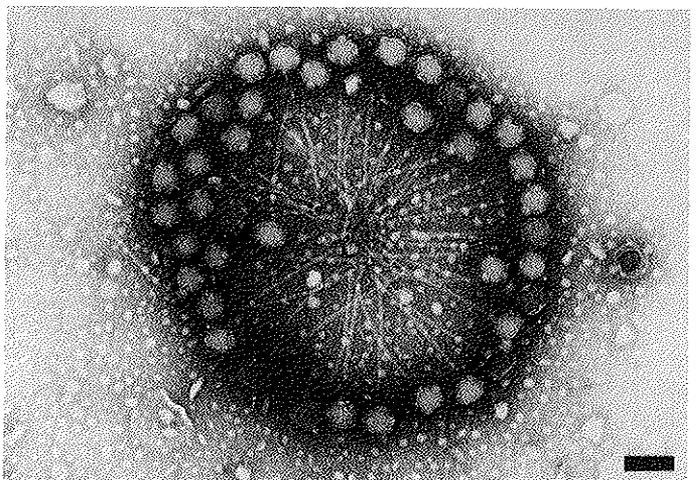
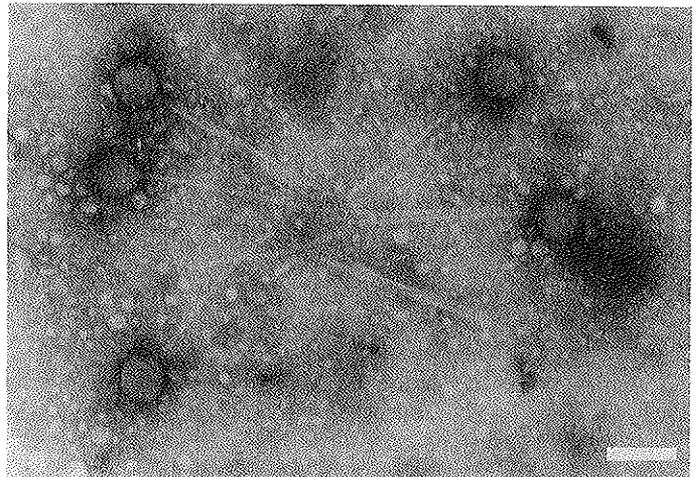
- Prolate Kopfform [132x51 nm], intakt oder leer mit flexiblem, nicht-kontraktilen Schwanz [Länge 282 nm] mit einer groben Segmentierung (**Abb. 4 und 5**).

### 3.4 Käserei B

In der Käserei B sind während des Einsatzes der RMK 101 und 302 bei der Emmentalerproduktion Säuerungsstörungen aufgetreten. Dabei konnten in Gärproben, Labgärmolken und Ausrührsirtten Phagenaktivitäten gegen die Laktobazillen der beiden Kulturen festgestellt werden. Wie aus den **Abbildungen 6a und 6b** hervorgeht, trat immer der gleiche Phagentyp auf:

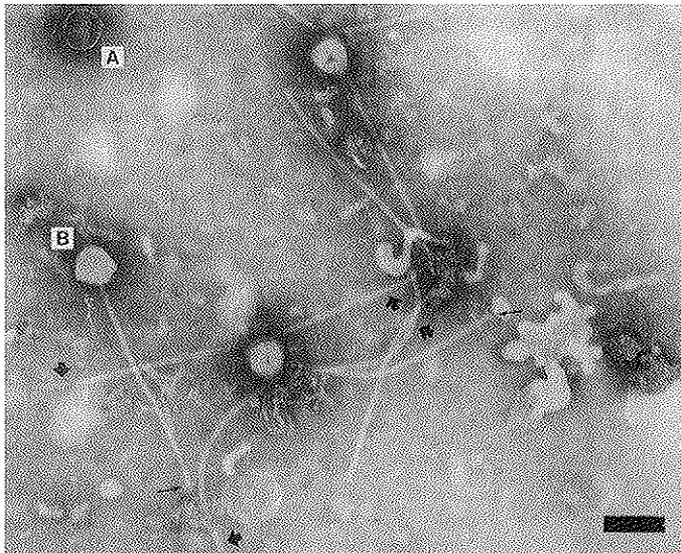
- Isometrische (wahrscheinlich oktaedrische) Kopfform [Durchmesser 64 nm] und flexibler, nicht-kontraktiler Schwanz [Länge 274 nm] mit feiner Querstreifung und einer schmalen Endplatte.

**Abb. 1a und 1b:** Rosettenförmige Anordnung von Phagen der Streptokokken aus RMK 101 (Marker = 100 nm)



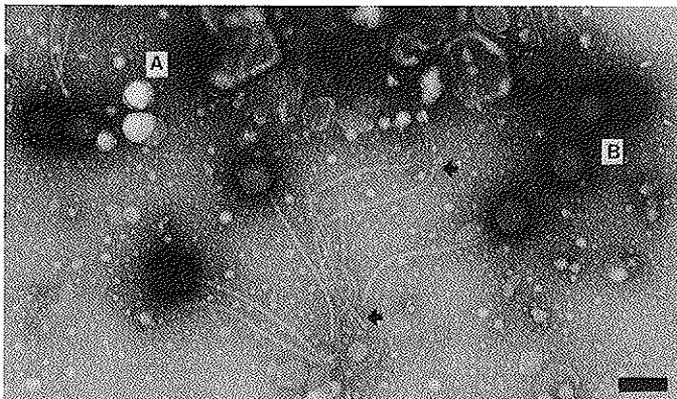
**Abb. 2a und 2b:** Defekte (A) und intakte (B) Phagenpartikel, aktiv gegen *Laktobazillus lactis*-Stämme

→ evtl. Endplatte  
 → «Polytail»  
 (Marker = 100 nm)

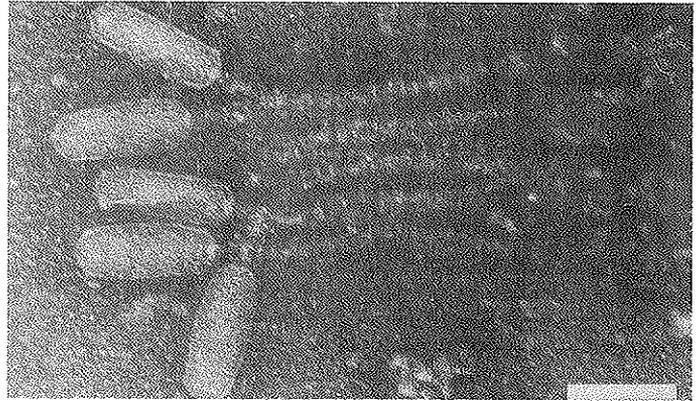


**Abb. 3:** Defekte (A) und intakte (B) Phagenpartikel, aktiv gegen Laktobazillen aus RMK 101 und 157

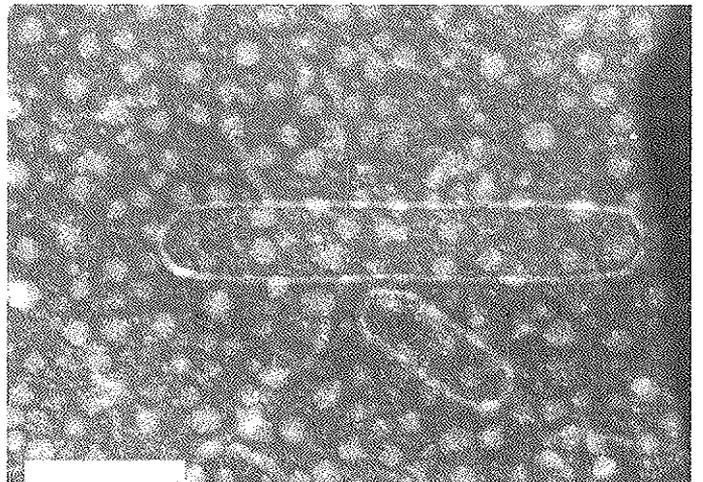
→ evtl. Endplatte  
 → zwei «Polytails»  
 (Marker = 100 nm)



**Abb. 4:** Intakte temperente Phagen, nach Induktion aus lysogenen *Laktobazillus lactis*-Stämmen freigesetzt (Marker = 100 nm)

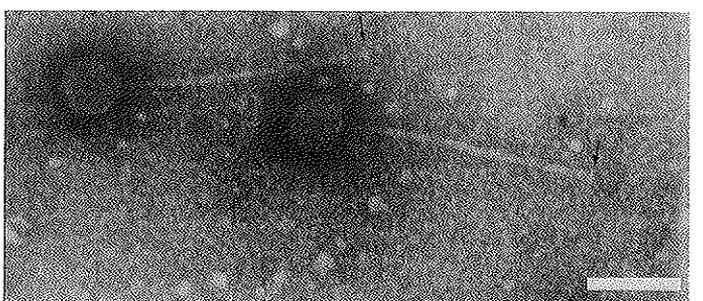
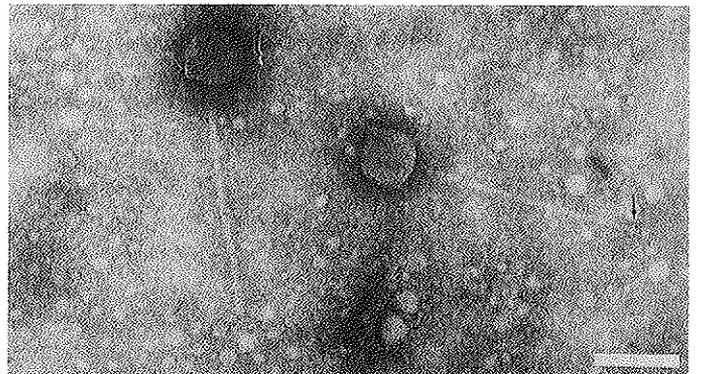


**Abb. 5:** Leerer Phagenkopf in normaler Grösse und riesige Kopfform («Monster») aus *Laktobazillus lactis*-Stämmen (Marker = 100 nm)



**Abb. 6a und 6b:** Phagen der Laktobazillen aus RMK 101 und 302

→ schmale Endplatte  
 (Marker = 100 nm)



**Tabelle 2:** Vergleich der isolierten Phagentypen mit Beschreibungen in der internationalen Literatur

In dieser Arbeit beschriebene Isolate		In der internationalen Literatur beschriebene Isolate		
Phagenherkunft/Käserei	Dimensionen (nm): Kopf/Schwanz	Wirtsstamm	Dimensionen (nm)	Autor
Sc. aus RMK 101/A	64/258	Sc. thermophilus Sc. thermophilus Sc. thermophilus Sc. thermophilus Sc. cremoris Sc. lactis Sc. thermophilus	70/237 60/255 60/240 60/236 65/260 55/255 60-65/222-290	(1), (13) (1) (1) (12) (10) (10) (13)
Lb. lactis/A und Lb. aus RMK 101 + 157/A	75/386 76/384			
Lb. lactis (nach Induktion)	51 x 132/282	Lb. salivarius	(51-53) x (100-110) / 173 x 200	(17)
Lb. aus RMK 101 + 302/B	64/274	Lb. acidophilus Lb. bulgaricus Lb. casei Lb. lactis Lb. plantarum Lb. salivarius	50-76/200-290	(17)

Sc. = Streptokokken  
Lb. = Laktobazillen  
RMK = Rohmischkultur

### 3.5 Literaturvergleich

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen und morphologisch charakterisierten Phagen sollen nun noch mit ähnlichen, evtl. identischen, in der internationalen Literatur aufgeführten Isolaten verglichen werden. Der **Tabelle 2** ist ferner zu entnehmen, dass sich für einen in der Käserei A isolierten Phagentyp keine ähnliche Beschreibung findet.

## 4. Diskussion

Beim Aufarbeiten der phagenhaltigen Filtrate für elektronenmikroskopische Darstellungen war es wegen der Titerunterschiede nötig, verschiedene Präparationsverfahren anzuwenden. Bei Phagentitern von  $\geq 10^6$  Partikeln/ml wurde das Rohfiltrat direkt negativkontrastiert, wobei mit gutem Erfolg Phagen im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden konnten. Von den beiden anderen Aufarbeitungsverfahren erwies sich die Methode der Ultrazentrifugation/Dialyse vom Aufwand und vom Grad der Verunreinigung her der Polyethylenglykol-Anreicherungstechnik überlegen. Keine Unterschiede konnten mit den zwei eingesetzten Negativkontrastierungslösungen Phosphorwolframsäure bzw. Uranylazetat festgestellt werden. Bedeutender als seine Wahl war die Einstellung des pH-Wertes des Färbemittels, wobei sich Werte von 4,5 bis 5 als geeignet zeigten. Bei zu starken Abweichungen von diesen Werten traten entweder eine störende Kristallbildung oder viele defekte Phagenpartikel (evtl. infolge eines pH-Schocks) auf. Um vermeidbare Fehlerquellen bei den Präparationen möglichst auszuschliessen, wurden speziell vorgeschlagene Richtlinien beachtet (3).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Phagen gehören alle zum Typ B nach BRADLEY (5), wobei mit Ausnahme der temperenten Phagen aus den Laktobazillus lactis-Stämmen (Subtyp B3) sämtliche Isolate dem Subtyp B1 nach ACKERMANN et al. (4) angehören.

Durch den Vergleich der verschiedenen Isolate aus den zwei Käsereien lässt sich erkennen, dass jeder Betrieb seine spezifische Phagenflora haben könnte. In keinem Fall ist dasselbe Phagenisolat in beiden Käsereien aufgetreten, obwohl

teilweise die gleichen Kulturen (z. B. RMK 101 und 302) eingesetzt wurden. Für diese Feststellung spricht auch die Tatsache, dass die aus Laktobazillus lactis-Stämmen nach Induktion im Labor freigesetzten temperenten Phagen morphologisch mit den aus dem entsprechenden Käsereiversuch aus gärungstechnischen Proben bzw. Käse isolierten Phagen keine Gemeinsamkeiten aufwiesen.

Im Laufe der elektronenmikroskopischen Untersuchungen sind zusätzlich drei Beobachtungen gemacht worden, die noch kurz diskutiert werden sollten.

- Die in der Käserei A isolierten und gegen Streptokokken aktiven Phagen sind im Elektronenmikroskop sehr häufig als sternförmige Rosetten mit nach innen gerichteten Schwänzen aufgetreten. Die Schwänze schien an bakterielles Zellmaterial adsorbiert zu sein, wobei jedoch auch eine spezifische Anlagerung an gewisse Bestandteile des Ammoniumazetat-Puffers beim Aufnehmen des Sedimentes nach der Ultrazentrifugation in Frage kommen könnte.
- Aus verschiedenen Proben der gleichen Käserei sind neben Phagenpartikeln auch extrem lange Schwänze vom Typ «Polytail» beobachtet worden. ACCOLAS et al. (2) haben solche Schwanzformen für Phagen von Laktobazillus bulgaricus und -lactis nachgewiesen, wobei Längen von 600 bis 700 nm auftraten. Die Bildung dieser «Polytails» hängt wahrscheinlich in erster Linie von der Dauer der Inkubation ab. Lange Bebrütungszeiten wirken für «Polytail»-Formationen begünstigend (13). Eine mögliche Erklärung für die Entstehung könnte in der nicht-aufhörenden Kodierung der Zusammenlagerung der Schwanzuntereinheiten liegen (7).
- Bei der Induktion der Laktobazillus lactis-Reinstämme wurden verschiedentlich sehr grosse prolate Kopfformen ohne Inhalt und ohne Schwanzstrukturen isoliert. Diese «Monster» (9), (11) bilden sehr variable Grössen, wobei es sich offenbar um expandierte Kapsidformen handelt, die neben der Nukleinsäure auch alle inneren Proteine infolge eines fehlerhaften Ablaufs der Phagenkopfbildung verloren haben (8).

## Résumé

### Microscopie électronique de phages de bactéries lactiques thermophiles dans des fromageries à pâte dure

Dans deux entreprises de fabrication de fromage à pâte dure, on a pu détecter par microscopie électronique, à différents stades de la fabrication et de la maturation des fromages, trois types de phages morphologiquement similaires (deux agissant contre les lactobacilles et un contre les streptocoques). Le diamètre de la tête des isolats variait entre 64 et 76 nm et la longueur de la queue entre 258 et 386 nm. Les trois types avaient des têtes de forme isométrique et des queues non-contractiles, rayées transversalement et flexible avec ou sans plaque terminale clairement reconnaissable. Ils ont tous été classés sous type B selon BRADLEY (5) et sous-type B1 selon ACKERMANN et al. (4).

Les phages décrits ont été trouvés dans le lactofermentateur, le sérum du lactocoagulateur, le petit-lait de sortie, les échantillons de fromage âgé d'un et de 150 jours et, plus rarement, dans le lactosérum chauffé et retourné aux fournisseurs du lait.

Un type de phage différent, tempéré, avec tête allongée (132×51 nm) et queue à gros segments (longueur 282 nm) a été détecté après induction de souches pures de *Lactobacillus lactis* lysogène. Cet isolat a été classé sous sous-type B3 d'après ACKERMANN et al. (4). Outre des phages intacts et partiellement instables, on a constaté pour certains filtrats des queues extrêmement longues (type «polytail» dépassant 600 nm) et des têtes énormes de forme ovale variable (type «Monster» dépassant 300 nm).

## Abstract

### Electron microscopy of phages from thermophilic lactic acid bacteria in hard cheese factories

In two hard cheese factories we have detected with electron microscopy at different stages of cheese manufacture and ripening three morphologically similar phage types (two of them acting against lactobacilli and one against streptococci). The head diameter of the isolates varied from 64 to 76 nm and the tail length from 258 to 386 nm. The head form of all phage types was isometric, the tails were not contractile, horizontally striped and flexible with or without clearly recognizable end plates. The phages could all be assigned to type B after BRADLEY (5) and subtype B1 after ACKERMANN et al. (4).

The phages described were found in lactic fermentation test samples, rennet whey, stir-out whey, 1- and 150-day old cheese samples and rather seldom in skimmed whey, heat-treated and returned to milk producers.

A different phage type, temperate, with prolate head (132×51 nm) and coarse-segmented tail (282 nm long) was found after induction of lysogenic *Lactobacillus lactis* pure strains. This isolate was classified under subtype B3 according to ACKERMANN et al. (4). Besides intact and partly unstable phages we also found filtrates with extremely long tails (type «polytail» longer than 600 nm) and enormous heads of variable oval shape (type «Monster» longer than 300 nm).

## Literatur

- 1 ACCOLAS, J. P. und SPILLMANN, H.: J. appl. Bact., **47**, 135–144 (1979)
- 2 ACCOLAS, J. P. und SPILLMANN, H.: J. appl. Bact., **47**, 309–319 (1979)
- 3 ACKERMANN, H.-W., AUDURIER, A., BERTHIAUME, L., JONES, L. A., MAYO, J. A. und VIDAVER, A. K.: Adv. Virus Res., **23**, 1–24 (1978)
- 4 ACKERMANN, H.-W. und EISENSTARK, A.: Intervirology, **3**, 201–219 (1974)
- 5 BRADLEY, D. E.: Bact. Rev., **31**, 230–314 (1967)
- 6 DE MAN, J. C., ROGOSA, M. und SHARPE, M. E.: J. appl. Bact., **23**, 130–135 (1960)
- 7 KELLENBERGER, E.: Polymerization in Biological Systems, Ciba Foundation Symposium, **7**, 189–206, Amsterdam: ASP (1972)
- 8 KELLENBERGER, E.: Bio Systems, **12**, 201–223 (1980)
- 9 KING, J., BOTSTEIN, D., CASJENS, S., EARNSHAW, W., HARRISON, S. und LENKE, E.: Philos. Trans. R. Soc. Lond., **276**, 37–49 (1976)
- 10 LEMBKE, J., KRUSCH, U., LOMPE, A. und TEUBER, M.: Zbl. Bact. I. Abt. Orig. CI, 79–91 (1980)
- 11 RAY, P. und MURIALDO, H.: Virology, **64**, 247–263 (1975)
- 12 REDDY, M. S.: Ph. D. Thesis, Iowa State University (1974)
- 13 REINBOLD, G. W., REDDY, M. S. und HAMMOND, E. G.: J. Fd Prot., **45**, 119–124 (1982)
- 14 SCHIMMEL, G. und VOGELL, W.: Methodensammlung der Elektronenmikroskopie, Wiss. Verlagsges. MBH, Stuttgart (1975)
- 15 SOZZI, T., MARET, R. und POULIN, J.-M.: Appl. Environ. Microbiol., **32**, 131–137 (1976)
- 16 SOZZI, T., POULIN, J. M. und MARET, R.: J. Dairy Res., **45**, 259–265 (1978)
- 17 SOZZI, T., WATANABE, K., STETTER, K. und SMILEY, M.: Intervirology, **16**, 129–135 (1981)
- 18 YAMAMOTO, K. R. und ALBERTS, B. M.: Virology, **40**, 743–744 (1970)