

Phagenkontaminationslage in schweizerischen Käsereien

III. Stufenkontrolle in einer Raclette-Käserei

J. Schmidlin und H. Spillmann
Laboratorium für Milchwissenschaft
Institut für Lebensmittelwissenschaft
Eidg. Technische Hochschule Zürich
Eingereicht am 15. November 1979

Die Stufenkontrolle in einer Halbhartkäserei (Raclette) sollte Auskunft geben über Herkunft und Verbreitung von Bakteriophagen. Die mesophile Betriebskultur wurde als Hauptkontaminationsquelle mit 5×10^6 Phagen/ml erkannt. Die Rohmilch, welche zur Käseherstellung diente, sowie Lab und Wasser waren frei von virulenten Phagen. Da sich die im Betrieb angewendeten Reinigungs- und Desinfektionsmittel als sehr wirksam gegenüber den isolierten Phagen erwiesen, ist anzunehmen, dass die an den Gerätschaften gefundenen max. 300 Phagen/dm² auf Rekontamination mit Molke zurückzuführen sind. Während der Käseherstellung wurde nur eine unbedeutende Erhöhung des Phagentiters nachgewiesen. Die drei isolierten Phagen sind auf ihre Hitzeresistenz bei 65, 72 und 90 °C geprüft worden. Die D₆₅-Werte für die zwei Str. cremoris und den Str. diacetylactis-Phagen lagen bei 22 und 770, bzw. 62 Minuten. Die entsprechenden D₇₂-Werte betrugen 0,09 und 5, bzw. 12 Minuten. Bei 90 °C wurden die Phagen in max. 5 Sekunden eliminiert.

1. Einleitung

Nach den heutigen Erkenntnissen kommen die Phagen ubiquitär vor und vermehren sich sobald sie mit einem sensitiven Bakterienstamm zusammenkommen.

In Käsereien stellt die Rohmilch eine mögliche Phagenquelle dar. HEAP und LIMSOWTIN (5) untersuchten Rohmilchproben aus verschiedenen Gebieten Neuseelands auf temperente Phagen und fanden dabei, dass die Mehrheit der isolierten Str. lactis-Stämme lysogen waren. Demzufolge sind temperente Phagen von «wilden» Lactis-Stämmen als eine der möglichen Phagenquellen anzusehen. Zudem kann aber die Milch auch mit virulenten Phagen kontaminiert sein, zum Beispiel aus der Molke über die Milchkanne. Enthält nun der Säurewecker für die eingeschleppten Phagen empfindliche Milchsäurebakterien, so besteht die Gefahr, dass sich die Bakteriophagen während des Fabrikationsprozesses anreichern und später in der Molke auftreten. Die Phagen werden einerseits direkt mit der Molke übertragen, können aber andererseits auch in winzigen Tröpfchen in die Luft gelangen. Als feinste Staubteilchen setzen sie sich wegen ihrer geringen Grösse nur langsam ab und gelangen später aus der Luft wieder in die Milch (16). Einer der wahrscheinlichen Phagen-Kreisläufe wäre somit: Milch—Molke—Luft—Milch.

Neuere Untersuchungen von HUGGINS und SANDINE (6) zeigen, dass der Säurewecker selbst eine ergiebige Phagenquelle darstellen kann. BABELLA und MIKE-ZSINKO (1) fanden, dass in Ungarn der charakteristische Phagentiter in der Molke von Schnittkäse 10^7 — 10^8 Phagen/ml betrug. In 13 Betrieben war trotzdem nur eine geringe Verzögerung der Säuerung, und dann nur während einigen Tagen, zu beobachten. Bedeutende Säuerungsstörungen über einen längeren Zeitraum traten nur in vier Käsereien auf.

Von grosser Bedeutung für einen Betrieb ist die Resistenz von Phagen gegen Reinigungs- und Desinfektionsmittel. Die von SOZZI und MARET (8) untersuchten Phagen thermophiler Milchsäurebakterien überlebten mindestens während 30 Minuten in einer Lösung mit 100 ppm aktivem Chlor. CIBLIS (3) untersuchte das Verhalten eines Streptokokkus thermophilus-Phagen in mehreren Reinigungs- und Desinfektionsmitteln bei 40 °C während 1 Minute. Die in der Praxis angewandten Konzentrationen von 0,5—2% (Natriumhypochlorit, P₃ zinnfest, Calgonit G) inaktivierten den Phagenstamm vollständig. In der 0,1—1%igen H₂O₂-Lösung wurde hingegen noch ein kleiner Prozentsatz infektiöser Phagen gefunden.

Ebenfalls von grosser praktischer Bedeutung ist die Hitzeresistenz der Bakteriophagen. Im allgemeinen war zu be-

obachten, dass zur Inaktivierung von Streptokokken-Phagen höhere Temperaturen erforderlich sind als für ihre Wirtszellen. ENGEL (4) fand 2 Streptokokken-Phagen, welche in deutschen Käsereien ausserordentlich verbreitet sind, die durch 60 Sekunden Erhitzung auf 72 °C und 60 Minuten auf 65 °C nicht erkennbar beeinträchtigt wurden. Gegen die Einschleppung dieser Phagen mit der Rohmilch bietet die Pasteurisierung bei den erwähnten Temperaturen keinen wirksamen Schutz. ZOTTOLA und MARTH (17) berechneten bei 2 Str. lactis-Phagen in Milch D₇₂-Werte (dezimale Reduktionszeit in Minuten bei 75 °C) von 20 und 25. In die Praxis umgesetzt heisst das, dass eine 20- bzw. 25-minütige Heisshaltung bei 75 °C nur eine 90%ige Reduktion der Phagenpopulation bewirkt.

Trotz mehreren Publikationen über den Nachweis von Bakteriophagen in Käsereien fehlen genauere Erkenntnisse über Herkunft und Vorkommen der Phagen beim Fabrikationsprozess. Eine umfassende Stufenkontrolle in einer Halbhartkäserei soll Auskunft geben über die Kontaminationslage am Beispiel der Herstellung von Raclette-Käse. Aus diesem gewerblichen Betrieb wurden Phagen isoliert und ihr Verhalten gegenüber handelsüblichen Reinigungs- und Desinfektionsmitteln geprüft. Schliesslich wurde die Hitzeresistenz der Phagen bei Pasteurisationsbedingungen bestimmt.

2. Experimenteller Teil

Probenerhebung: Bei trockenen Oberflächen von Gerätschaften wurde eine definierte Oberfläche von 1 dm² mit einem in Verdünnungslösung getränkten Wattetupfer abgewischt, der Tupfer in 10 ml Verdünnungslösung getaucht und diese danach steril filtriert. Reinigungsbürste und Käsetuch sind mit 200 ml Verdünnungslösung gespült worden.

Das Homogenisieren der Käseproben erfolgte im STOMACHER mit 5 Teilen Verdünnungslösung.

Die Luftprobe wurde mit einer Porton-Impinger-Flasche bei einem Volumenstrom von 1 l/min. gewonnen. Als Vorlage dienten 40 ml steriles Leitungswasser.

Kulturmedium: M17-Medium nach TERZAGHI und SANDINE (13) wobei die Laktosekonzentration gemäss neuer Empfehlung auf 0,8% angehoben wurde (14). Als Verdünnungslösung diente für alle Versuche eine 1:10 verdünnte M17-Bouillon.

Indikatorstämme: Der Nachweis von Phagen in der Stufenkontrolle erfolgte mit 7 Str. cremoris und 3 Str. diacetylactis-Stämmen aus der Institutssammlung. Nach Erfahrung

aus früheren Versuchen (12) kann mit diesen 10 Stämmen eine grosse Zahl verschiedener Phagen erfasst werden. Die Stufenkontrolle erfolgte nach den Angaben in Tab. 1.

Gewinnung der Phagen-Suspension: 30—40 ml Probe wurden während 15 min. bei 3000 g zentrifugiert. Bei nicht sauren Proben wie Milch erfolgte vorher eine Einstellung mit Milchsäure auf pH 4,8—5,0. Der Ueberstand wurde mit SARTORIUS-Membranfilter (Typ SM 11107, Porengrösse 0,2 µm) sterilfiltriert und anschliessend kühl gelagert.

Phagennachweis und -zählung: Die von TERZAGHI und SANDINE (13) beschriebene Methode wurde modifiziert, indem wir Calciumchlorid, Wirt und Probe direkt dem bei 46 °C flüssig gehaltenen Weich-Agar zumischten. Die Bebrütung erfolgte während 20 Std. bei 30 °C unter aeroben Bedingungen. Bei der Annahme, dass jede Plaque einem Phagen entspricht, verzichteten wir bei der Darstellung der Ergebnisse auf die übliche Angabe in pfu/ml (plaque forming units). Bei dieser Methode liegt die Nachweisgrenze bei 10 Phagen/ml.

Isolierung und Reinigung der Phagen: Diese erfolgte nach einer modifizierten Methode von TERZAGHI und SANDINE (13). Mit einer Pasteurpipette wurde von einer Platte mit hoher Verdünnung von einem typischen Plaque phagenhaltiges Material in M17-Bouillon übertragen. Zu 10 ml Bouillon gaben wir 0,1 ml einer 1M CaCl₂-Lösung sowie 0,1 ml Wirtsstamm-Suspension. Die Bebrütung bei 30 °C dauerte bis zur Lyse, was in der Regel nach 4—6 Std. erfolgte. Anschliessend wurde zentrifugiert, sterilfiltriert und in Verdünnungsstufen mit der Doppelschicht-Agar-Methode ausplattiert. Zur Reinigung der Phagenpopulation wurde dreimal ausplattiert und ab Einzelplaque reisoliert.

Anreicherung der Phagen: Die Verdünnungsstufen der isolierten und gereinigten Phagen brachten wir mit einer, während einer Stunde vorbebrüteten Wirtsstamm-Kultur zusammen und inkubierten weiter. Von den durch Lyse klar gewordenen Bouillon-Kulturen wurde der Phagentiter bestimmt. Die Phagensuspension mit dem höchsten Titer diente für die Versuche.

Resistenz gegen Reinigungs- und Desinfektionsmittel: Die Bestimmung erfolgte nach dem IDF-Standard Nr. 19 (1962) wobei zu 99 ml Reinigungs- oder Desinfektionsmittel-Lösung 1 ml Phagensuspension gegeben wurde. Nach der gewünschten Einwirkungszeit entnahmen wir 1 ml Probe, verdünnten diese mit 9 ml M17-Bouillon, um die desinfizierende Wirkung zu unterbinden. Danach erfolgte die Bestimmung der überlebenden Phagen. Die Nachweisgrenze liegt bei 100 Phagen/ml Testlösung.

Der Suspensionstest mit Belastung wurde unter Zusatz von 2% Magermilch zur Testlösung durchgeführt. Die Zugabe der Magermilch erfolgte gleichzeitig mit derjenigen der Phagensuspension.

Alle Versuche wurden bei 20 °C ausgeführt.

Um quantitative Aussagen über die Inaktivierung der Phagen zu erhalten, ist es vorteilhaft, den Grad der Inaktivierung als sogenannten Reduktionsfaktor und nicht als Prozentsatz der inaktivierten Phagen anzugeben. In Anlehnung an die Empfehlung von BECK et al. (2) ist der Reduktionsfaktor (RF) wie folgt definiert:

$$RF = \log \text{ pfu/ml } \text{unbehandelt} - \log \text{ pfu/ml } \text{desinfiziert}$$

Tabelle 2 gibt die geprüften Reinigungs- und Desinfektionsmittel an.

Hitzeinaktivierung: 10 ml M17-Bouillon (pH 6,77) wurden in einem Reagenzglas mit Schraubverschluss auf die Testtemperatur eingestellt. Ein Kapillarröhrchen von 10 µl wurde sorgfältig mit Phagensuspension (möglichst hoher Titer) gefüllt und danach ohne die Glaswand zu berühren in die heisse Bouillon fallengelassen. Nach der Einwirkungszeit erfolgte die sofortige Abkühlung durch Eintauchen des Reagenzglases in Eiswasser. Mit diesem Vorgehen konnte die Aufheiz- und Abkühlzeit sehr kurz gehalten werden. Nach intensivem Schütteln der abgekühlten Probe erfolgte die Bestimmung der überlebenden Phagen. Zur Bestimmung der Ausgangsphagenzahl diente eine in gleicher Weise behandelte, jedoch nicht erhitzte Probe.

Tabelle 1: Schema der Phagen-Stufenkontrolle in der Raclette-Käserei

Zeit Min.	Operation	Probe	
		Nr.	Bezeichnung
Käseherstellung			
	Rohmilch, 5 000 l (von Sonntagabend, Montagmorgen u. -abend)	1	Roh-Mischmilch (aus Vorlaufgefäss)
	Milchvorbehandlung		
	Vorwärmen		
	Zentrifugieren		
	+ 1 Kanne Sirtenrahm	2	Sirtenrahm, nicht past.
	Pasteurisieren, 75 °C	3	Pasteurisierte Kessmilch
0	Kulturzugabe 1/2%	4	Betriebskultur
	Calciumchlorid, 500 g	5	Calciumchlorid in 10 l Wasser
10	Labzugabe, 1 Liter	6	Labextrakt, verdünnt auf 10 l
		7	Eingelabte Milch
	Bruchbereitung		
35	Schneiden		
55	Rühren		
	Molke ablassen, 600 l		
		8	Wasser vor Pasteur
70	Waschwasser 65 °C, 600 l	9	Wasser nach Pasteur
	Nachwärmen auf 36 °C		
	Molke ablassen	10	Molke vor Vorpressen
90	Vorpressen (im Fertiger)		
105	Portionieren	11	Molke nach Vorpressen
	Pressen		
115	1. Wenden	12	Käse, pH 6,36
ca.	Käse in Salzbad	13	Käse vor Salzbad
10 h	wenn pH 5,15—5,20		
		14	Salzbad
24 h	Molkenlagerung	15	Molke aus Lagertank
Gerätschaften			
		16	Trockene Fertigerwand
		17	Reinigungsbürste
		18	Vorpressieb
		19	Kelle
		20	Vorpressplatte
		21	Käsetuch
		22	Järb, Innenseite
Umgebung			
		23	Luft, 0,5 m ³ (von Milcheinlauf bis Dicklegung)
		24	Rührwerkabdeckung (Unterseite)
		25	Abwasser aus Siphon
Personal			
		26	Schürze des Käfers
		27	Hände ungewaschen
		28	Hände gewaschen

Tabelle 2: Verwendete Reinigungs- und Desinfektionsmittel für den Phagen-Resistenztest¹

Handelsbezeichnung und Anwendungsgebiet	vom Hersteller empfohlen Konzentration	Temperatur und Zeit	im Suspensionstest Konzentration	pH
P ₃ standard nur Reinigung	1—2%	handwarm bis kochend 5—10 Min.	1%	12,15
P ₃ -z-spezial Reinigung u. Entkeimung	0,5—2%	40—60 °C	1%	11,35
P ₃ -z-on	0,5—1% (verlorene R.)	60—70 °C	1%	11,40
Reinigung u. Entkeimung	1,5—2% (CIP)	3—10 Min.		
P ₃ Hypochloran-H nur Entkeimung	0,1—0,25% bei CIP	25—30 °C 10—20 Min. bei CIP	0,1%	9,45

¹ Die R+D-Mittel sind in verdankenswerter Weise von der Firma Henkel & Cie. AG Pratteln zur Verfügung gestellt worden

3. Ergebnisse und Diskussion

Von der Stufenkontrolle erwarteten wir Antwort auf folgende Fragen:

- Wird die Phagenkontamination durch Rohstoffe, Kultur, Gerätschaften, Umgebung oder Personal verursacht?
- Wie entwickelt sich der Phagentiter während der Käsefabrikation?

Tabelle 3 enthält die Ergebnisse der Stufenkontrolle.

Tabelle 3: Stufenkontrolle auf Phagen in der Raclette-Käserei

Nr.	Probe Bezeichnung	Phagen pfu/ml, g, dm ²
1	Roh-Mischmilch	<10
2	Sirtenrahm	6,2 × 10 ³
3	Past. Kessimilch	<10
4	Betriebskultur	4,6 × 10 ⁸
5	Calciumchloridlösung	90
6	Lab	<10
7	Eingelabte Milch	1,2 × 10 ⁵
8	Wasser vor Pasteur	<10
9	Wasser nach Pasteur	<10
10	Molke vor Vorpressen	8,6 × 10 ⁴
11	Molke nach Vorpressen	9,7 × 10 ⁴
12	Käse vor 1. Wenden	3,3 × 10 ⁴
13	Käse vor Salzbad	7,5 × 10 ⁴
14	Salzbad	7,3 × 10 ³
15	Schotte aus Lagertank	3,7 × 10 ³
16	Fertigerwand	<10
17	Bürste	2,0 × 10 ²
18	Vorpresssieb	3,0 × 10 ²
19	Kelle	<10
20	Vorpressplatte	<10
21	Käsetuch	2,7 × 10 ³
22	Järb, Innenseite	4,8 × 10 ³
23	Luft, ½ m ³	2,0 × 10 ³
24	Rührwerkabdeckung	<10
25	Abwasser aus Siphon	4,3 × 10 ²
26	Schürze des Käasers	9,3 × 10 ³
27	Hände, ungewaschen	7,0 × 10 ⁴
28	Hände, gewaschen	<10

Rohstoffe: In Rohmilch, Lab und Wasser konnten keine Phagen nachgewiesen werden. Hingegen enthielt die CaCl₂-Lösung 90 Phagen/ml. Da sich das Wasser zum Lö-

sen von CaCl₂ als phagenfrei erwies, ist anzunehmen, dass die Phagenkontamination durch Molkenrückstände über den Eimer geschah.

Obwohl wir in der Rohmilch keine Phagen nachzuweisen vermochten, ist es durchaus möglich, dass in der Lieferantemilch Phagen vorkommen können. Dies gilt ganz besonders für Käseereien mit Molkenrückgabe an die Milchproduzenten.

Kultur: Im Betriebssäurewecker mit mesophilen homo- und heterofermentativen Milchsäurebakterien liess sich mit 4,6 × 10⁶ Phagen/ml ein sehr hoher Phagengehalt feststellen. Kulturen anderer Käseereien mit ähnlicher Fabrikation wiesen vergleichbare Phagentiter auf (11). Phagenzahlen in der hier aufgezeigten Grössenordnung scheinen also durchaus keine Seltenheit zu sein und brauchen sich nicht zwingend in einer Störung der Milchsäuregärung bemerkbar zu machen. Da gerade bei der Kulturbereitung eine möglichst aseptische Arbeitsweise beachtet wird, darf eine Kontamination in diesem Ausmass ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist es, dass der hohe Phagengehalt der Kultur auf spontane oder induzierte Freisetzung temperenter Phagen aus lysogenen Bakterien zurückzuführen ist. Lysogene Milchsäurebakterien-Stämme sind in den Kulturen sehr oft vorhanden. Nicht ausgeschlossen ist andererseits eine Kontamination der Kulturmilch über die Luft während der Beimpfung. Falls diese virulenten Phagen ihren Wirtstamm finden, könnte sich die anfänglich geringe Zahl während der Bebrütung der Kultur stark erhöhen.

Gerätschaften: Die Resultate in Tabelle 3 zeigen, dass Käsefertigerwand, Vorpressplatte, Rührwerkabdeckung und Kelle frei von Phagen waren und daher beim Vorkäsen keine Kontamination verursachten. Am Vorpresssieb konnten jedoch 300 Phagen/dm² nachgewiesen werden. Ueber die Vorpresssieb-Fläche von 5 m² gelangten insgesamt 1,5 × 10⁵ Phagen in den Käsebruch bzw. auf die Käseoberfläche.

Käsetuch und Holz-Järb waren stärker mit Phagen kontaminiert.

Da spätere Untersuchungen die hohe Wirksamkeit des im Betrieb verwendeten Reinigungs- und Desinfektionsmittels (P₃-z-on, Tab. 4 und 5) zeigen, ist nicht anzunehmen, dass die am Vorpresssieb und Holz-Järb festgestellten Phagen den Reinigungsprozess überlebten. Vielmehr ist zu vermuten, dass sie nachträglich über Hände, Schürzen oder Spritzer auf die gereinigte Oberfläche gelangt sind. Beim Käsetuch hingegen, das nur in kaltem Leitungswasser gespült und anschliessend getrocknet wird, ist von den Reinigungsmassnahmen her keine bedeutende Phagenreduktion zu erwarten.

Luft: Im Vergleich mit dem Keimgehalt einer sauberen Raumluft (200—1000 Keime/m³) ist der Phagentiter mit 4000 Phagen/m³ als hoch anzusehen. Interessanterweise wurde dabei ein Phagentyp festgestellt, der sonst in keiner Probe zu finden war.

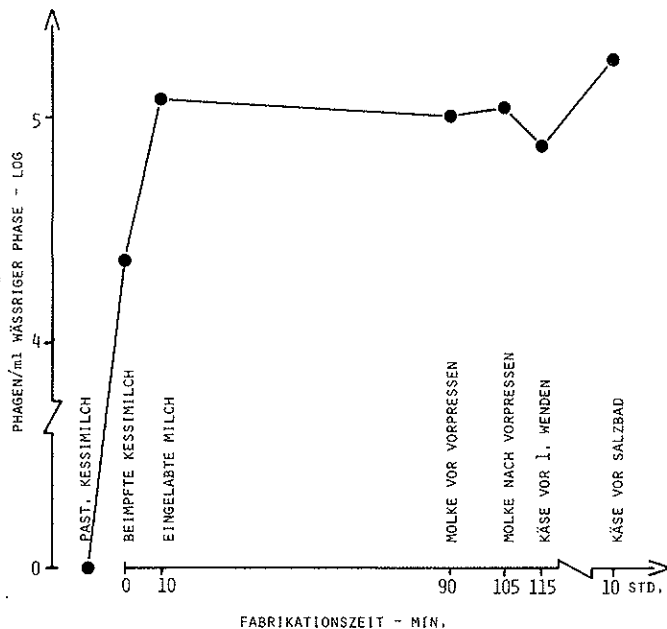
Personal: An der Schürze und den ungewaschenen Händen des Käasers waren relativ viele Phagen zu finden, die von der Molke stammen könnten, mit welcher der Käser während der Fabrikation zwangsläufig in Berührung kommt. Beachtenswert ist, dass routinemässiges Händewaschen im Waschtrog die Phagen eliminierte.

Abwasser und Salzbad: Der positive Phagennachweis in diesen Proben zeigt wiederum, dass die Phagen mit der Molke verschleppt wurden.

Phagentiter während der Fabrikation: Aus Abb. 1 ist die Beeinflussung des Phagentiters der Kessimilch durch die

Kultur deutlich ersichtlich. Während des Fabrikationsprozesses bis zur Salzbehandlung des Käses steigt der Phagentiter nur am Anfang der Fabrikation von $2,3 \times 10^4$ auf $1,2 \times 10^5$ Phagen/ml an, um sich dann während des ganzen Verlaufes praktisch nicht mehr zu verändern. THEYERL et al. (15) stellten in einer Camembert-Käserei während der Fabrikation eine ähnliche Phagenvermehrung fest.

Abb. 1: Veränderung des Phagentiters während der Raclette-Fabrikation



Für die weiteren Versuche haben wir aus der Betriebsphagen-Population folgende drei Phagen isoliert:

- Phage 11 mit Str. cremoris Stamm 11 als Indikator
- Phage 29 mit Str. cremoris Stamm 29 als Indikator
- Phage 32 mit Str. diacetylactis Stamm 32 als Indikator

Resistenz gegen Reinigungs- und Desinfektionsmittel

Beim Suspensionstest ohne Belastung mit Magermilch wurde die Wirksamkeit aller in Tab. 2 aufgeführten Reinigungs- und Desinfektionsmittel in empfohlener Konzentration gegen die Phagen 11 und 32 geprüft. Die Einwirkungszeit betrug max. 20 Minuten. Wie aus Tab. 4 hervorgeht, führte bereits die Einwirkungszeit von 30 Sekunden bei allen Mitteln zum maximal messbaren Reduktionsfaktor. Dies kann einer praktisch 100%igen Abtötung der eingepfachten Phagen gleichgesetzt werden. Um den Temperatureinfluss auszuschliessen, wurden diese Versuche bei 20 °C durchgeführt. Bei der vom Hersteller empfohlenen Anwendungstemperatur wäre daher eine noch höhere Wirksamkeit zu erwarten.

Im Suspensionstest mit Belastung (Tab. 5) zeigte nur das Desinfektionsmittel P₃-Hypochloran-H gegenüber den Phagen 11 und 32 selbst nach 20 Minuten Einwirkungszeit einen ungenügenden Reduktionsfaktor. In der Praxis muss daher die Verunreinigung der Desinfektionslösung mit Milchrückständen unbedingt vermieden werden.

Tabelle 4: Reduktionsfaktoren (RF) beim Suspensionstest mit Reinigungs- und Desinfektionsmitteln ohne Belastung

Phage	Anfangstiter der Testlösung Phagen/ml	Reduktionsfaktoren nach Einwirkungszeit von 30 Sek.			
		P ₃ standard	P ₃ -z-spezial	P ₃ -z-on	P ₃ Hypochloran-H
11	$1,3 \times 10^5$	>3,1 ¹	>3,1	>3,1	>3,1
32	$4,0 \times 10^7$	>5,6 ¹	>5,6	>5,6	>5,6

¹ RF 3,1 bzw. 5,6 bedeutet, dass nach der Einwirkungszeit bei einer Nachweisgrenze von 100 Phagen/ml keine Phagen mehr nachweisbar waren.

Tabelle 5: Reduktionsfaktoren (RF) beim Suspensionstest mit Reinigungs- und Desinfektionsmitteln mit 2% Belastung (Magermilch)

Phage	Produkt	Anfangstiter der Testlösung Phagen/ml	Reduktionsfaktoren nach verschiedenen Einwirkungszeiten (Min.)				
			1/2	1	5	10	20
11	P ₃ standard	$5,0 \times 10^4$	>2,7 ¹	>2,7	>2,7	>2,7	>2,7
	P ₃ -z-spezial	$5,0 \times 10^4$	>2,7	>2,7	>2,7	>2,7	>2,7
	P ₃ -z-on	$1,6 \times 10^7$	>5,2 ¹	>5,2	>5,2	>5,2	>5,2
	P ₃ Hypochloran-H	$1,6 \times 10^7$	2,5	2,4	2,4	2,4	3,2
32	P ₃ standard	$4,0 \times 10^7$	>5,6 ¹	>5,6	>5,6	>5,6	>5,6
	P ₃ -z-spezial	$4,0 \times 10^7$	>5,6	>5,6	>5,6	>5,6	>5,6
	P ₃ -z-on	$4,0 \times 10^7$	>5,6	>5,6	>5,6	>5,6	>5,6
	P ₃ Hypochloran-H	$4,0 \times 10^7$	2,0	2,0	2,2	2,3	3,1

¹ RF >2,7 bzw. >5,2 bzw. >5,6 bedeutet, dass nach der Einwirkungszeit bei einer Nachweisgrenze von 100 Phagen/ml keine Phagen mehr nachweisbar waren.

Hitzeresistenz

In Bezug auf Hitzeresistenz zeigten die untersuchten Phagen beträchtliche Unterschiede. In Abb. 2 und 3 sind die Ueberlebenskurven und die zugehörigen linearen Regressionsgeraden der isolierten Phagen 11, 29 und 32 dargestellt.

Ueberlebensrate bei 65 °C: Abbildung 2 zeigt die Ueberlebenskurven bei 65 °C in M17-Bouillon. Von besonderem Interesse ist die Ueberlebensrate für die Dauererhitzung bei 65 °C während 30 Minuten. Phage 29 überstand diese Hitzebehandlung fast unbeschadet, dagegen zeigte Phage 32 nach 30 Minuten eine mittlere Ueberlebensrate von 32 Prozent und Phage 11 lediglich noch 4 Prozent. Die Ueberlebenskurven der letztgenannten Phagen 11 und 32 zeigen einen gebrochenen Verlauf. Als mögliche Erklärung für dieses Verhalten kommt eine inhomogene Phagensuspension in Frage. Aufgrund der durchgeführten Isolierungs- und Reinigungsschritte wie auch der einheitlichen Plaque-Grösse sind die Suspensionen jedoch mit grosser Sicherheit als homogen zu betrachten. Nicht lineare Kurven fanden u. a. KOKA und MIKOLAJCIK (7). Sie vermuten, dass zwei oder mehr Komponenten bzw. Reaktionen am Hitzeinaktivierungsprozess beteiligt sind.

Ueberlebensrate bei 72 °C: Erwartungsgemäss wurden die Phagen bei 72 °C rascher inaktiviert als bei 65 °C. Abb. 3 zeigt die Ueberlebenskurve der drei Phagen bei 72 °C in M17-Bouillon.

Abb. 2: Hitzeresistenz der Phagen 11, 29 und 32 bei 65 °C (Medium: M17-Bouillon, pH 6,77)

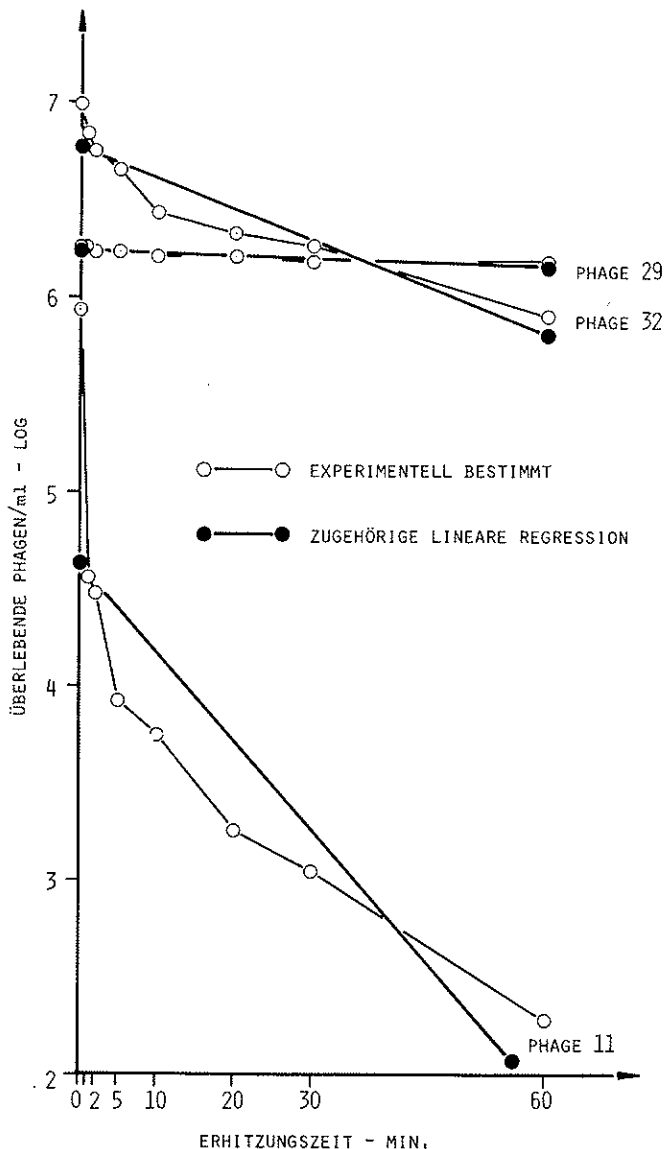
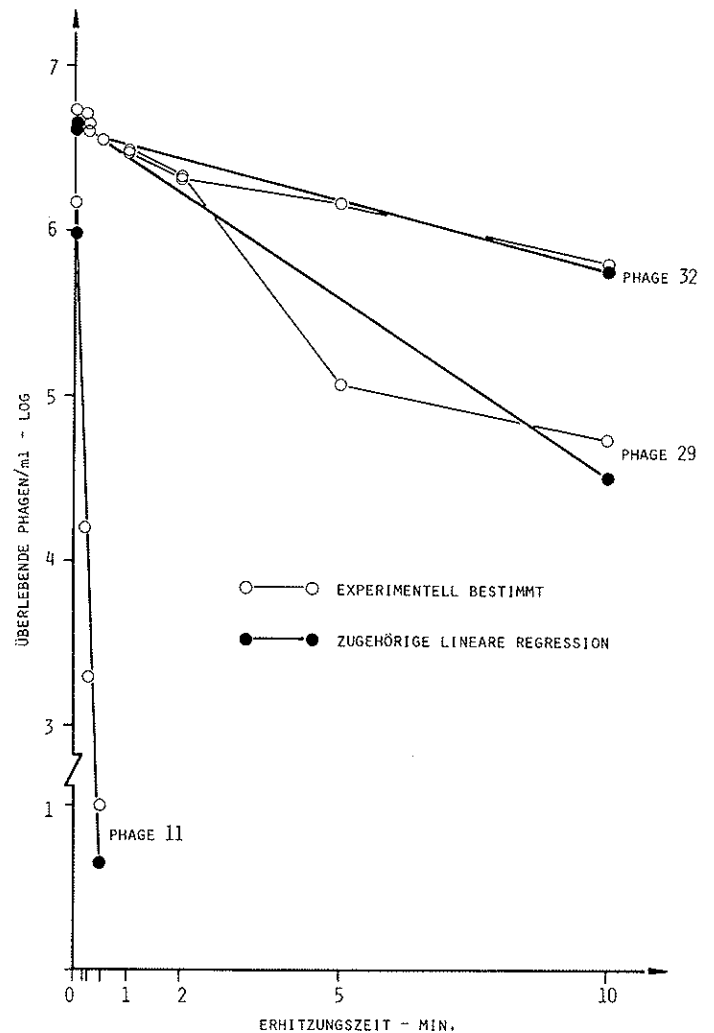


Abb. 3: Hitzeresistenz der Phagen 11, 29 und 32 bei 72 °C (Medium: M17-Bouillon, pH 6,77)



Ueberlebenskurve bei 90 °C: Die zwei Phagen mit der höchsten Ueberlebensrate bei 72 °C wurden bei 90 °C in Suspensionen mit sehr hohem Phagentiter von ca. 5×10^6 /ml schon nach 5 Sekunden praktisch eliminiert (Tab. 6). Diese Ergebnisse sind von Bedeutung für die Kulturmilchbereitung.

Tabelle 6: Ueberleben der Phagen bei 90 °C

Phage Nr.	Anzahl Phagen/ml nach Hitzebehandlung von		
	0	5 Sek.	10 Sek.
29	$5,5 \times 10^6$	<10	<10
32	$4,1 \times 10^6$	10	<10

Da die Käseemilch in der Regel bei 72—75 °C während mindestens 15 Sekunden hitzebehandelt wird, prüften wir die Resistenz auch bei 72 °C, 15 Sekunden. Phage 32 überlebte zu 95 Prozent diese Bedingungen, Phage 29 wies eine Ueberlebensrate von 88% auf. Ganz im Gegensatz dazu überlebten von Phage 11 nur 0,2% diese Hitzebehandlung.

Bemerkenswert ist die unterschiedliche Empfindlichkeit von Phage 29 und 32 im Hitzeresistenztest. Phage 29 zeigte bei 65 °C eine höhere Ueberlebensrate als Phage 32, während dies bei 72 °C umgekehrt war.

D-Werte: Aus den Ueberlebenskurven sind die in Tabelle 7 dargestellten D-Werte anhand der linearen Regression berechnet worden. Danach wäre bei 65 °C eine 770-minütige Haltezeit notwendig, um die Population des Phagen 29 um eine Zehnerpotenz zu vermindern. Bei 72 °C genügt bereits eine 12-minütige Haltezeit für die 90%ige Reduktion der hitzeresistenten Phagenpopulation. Da unsere Versuche in M17-Bouillon durchgeführt wurden, ist anzunehmen, dass im Milieu Milch noch mit längeren Haltezeiten zu rechnen wäre. KOKA und MIKOLAJCIK (7) konnten nämlich

bei ihren Versuchen in Magermilch immer eine höhere Ueberlebensrate als in Bouillon beobachtet, was auf eine gewisse schützende Wirkung der Milch hinweist.

Tabelle 7: D-Werte

Temperatur	Phage Nr.		
	11	29	32
65 °C	22	770	62
72 °C	0,09	5	12

4. Schlussfolgerungen

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen können die einleitend gestellten Fragen wie folgt beantwortet werden: Auch in einer gut und seit langer Zeit ohne Säuerungsstörung arbeitenden Käserei treten überall Phagen z. T. in sehr hoher Zahl auf. **Als wichtigste Phagenquelle wurde die Kultur erkannt.** Von dieser ausgehend sind die Phagen überall dort anzutreffen, wo ein Kontakt mit der Molke möglich ist. Von den erwähnten Phagenstandorten droht für die Säuerung eine potentielle Gefahr, insbesondere wenn sich dort vorhandene Phagen unter günstigen Bedingungen noch anreichern. Dazu können Phagen an trockenen Oberflächen recht lange infektiös bleiben (10). Den Reinigungs- und Desinfektionsmassnahmen kommt daher auch aus dieser Sicht eine grosse Bedeutung zu. Die Versuche haben gezeigt, dass die in Käsereien häufig verwendeten Reinigungs- und Desinfektionsmittel bei vorschriftsgemäsem Einsatz gegen die Phagen sehr wirksam sind. Konsequenterweise durchgeführte Hygienemassnahmen sind daher geeignet, den «Betriebsphagen-Pegel» — ausgenommen bei der Kultur — stets wirksam herabzusetzen und allfällige Phageninfektionsketten erfolgreich zu unterbrechen.

Bemerkenswert ist, dass sich die mit der Kultur in die Kessmilch eingeschleppten Phagen während des Fabrikationsprozesses nur unbedeutend vermehren. Eine Beeinträchtigung des Säuerungsverlaufes konnte trotz des relativ hohen Titors von ca. 10^5 Phagen/ml nicht festgestellt werden. Die Konstanz der Phagenzahl während der Käseherstellung kann folgendermassen erklärt werden:

- In der Kultur und somit in der beimpften Kessmilch sind keine Wirtsstämme vorhanden.
- Die Temperaturerhöhung während der Käsefabrikation auf 36 °C verhindert vorübergehend die Phagenvermehrung. SOZZI et al. (9) konnten nämlich mit Str. lactis-Phagen zeigen, dass bei einem Vermehrungsoptimum von 33 °C das Temperaturmaximum bei 35 °C resp. 37 °C lag. Darüber fand keine Phagenzunahme mehr statt, obwohl der Wirtstamm noch in der Lage war, sich zu vermehren.
- Andere, zum Teil noch nicht abgeklärte Mechanismen sind für den «Gleichgewichtszustand» in dieser heterogen zusammengesetzten Milchsäurebakterien/Phagen-Gesellschaft verantwortlich.

Résumé

Contamination par les bactériophages dans les fromageries suisses

3. Contrôle par étapes dans une fromagerie à raclette

Le contrôle par étapes dans une fromagerie à pâte demi-dure (Raclette) a permis de donner une indication sur l'origine et la propagation de bactériophages. Il s'est avéré

que le levain mésophile était la principale source de contamination avec 5×10^6 phages/ml. Le lait cru qui servait à la fabrication du fromage, comme la présure et l'eau étaient exempts de phages virulents. Comme les détergents et les désinfectants utilisés étaient très efficaces contre les phages isolés, l'on peut admettre que la recontamination du matériel de 300 phages/dm² maximum est due au petit-lait. Pendant la fabrication du fromage une augmentation insignifiante de phages a été observée. La résistance à la chaleur des trois phages isolés a été étudiée aux températures de 65, 72 et 90 °C. Les valeurs D₆₅ pour les deux Str. cremoris et le Str. diacetylactis s'élèvent à 22 et 770, respectivement 62 minutes. Les valeurs D₇₂ correspondantes atteignent 0,09 et 5, respectivement 12 minutes. A 90 °C les phages ont été éliminés en 5 secondes maximum.

Summary

Phage-contamination in swiss cheese factories

3. Step-wise examination in a raclette factory

The step-wise examination in a factory for semi-hard cheese (Raclette) would give information on the origin and location of bacteriophages. The mesophile starter culture was recognized as the main source of phages with 5×10^6 per ml. In the cheese-milk, in rennet as well as water no phages were found. The detergents and disinfectants used in the factory proved to be effective against the isolated phages. During cheese-making, only a slight increase of the number of phages was observed. Heat resistance at 65, 72 and 90 °C of the three isolated phages was determined. The D₆₅-Values for the two Str. cremoris- and the Str. diacetylactis-phage were at 22, 770 and 62 min. respectively. The corresponding D₇₂-values were 0,09, 5 and 12 min. respectively. At 90 °C, all phages were eliminated in less than 5 seconds.

Literaturverzeichnis

- 1 BABELLA, G. and MIKE-ZSINKO, M.: 20th Int. Dairy Cong., Vol. E, 556 (1978)
- 2 BECK, E. G. et al.: Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. P 165, 335—380 (1977)
- 3 CIBLIS, E.: 17. Int. Milchw. Kongress, Band C, 395—400 (1966)
- 4 ENGEL, G.: Kieler Milchw. Forsch. Ber., 27 (2), 91—100 (1975)
- 5 HEAP, H. A. and LIMSOOTIN, G. K. Y.: 20th Int. Dairy Cong., Vol. E, 552 (1978)
- 6 HUGGINS, A. R. and SANDINE, W. E.: Appl. Microbiol., 33 (1), 184—191 (1977)
- 7 KOKA, M. and MIKOLAJCIC, E. M.: J. Dairy Sci., 50 (7), 1025—1031 (1967)
- 8 SOZZI, T. et MARET, R.: Lait, 55 (545/546), 269—288 (1975)
- 9 SOZZI, T., POULIN, J.-M. and MARET, R.: J. Dairy Res., 45 (2), 259—265 (1978)
- 10 SPILLMANN, H., PUHAN, Z. und BANHEGYI, M.: Schweiz. Milchzeitung, 105 (80, 81, 83), 555—556, 563—564, 578 (1979)
- 11 SPILLMANN, H., PUHAN, Z. und BANHEGYI, M.: Schweiz. Milchw. Forsch., 8 (4), 59—64 (1979)
- 12 SPILLMANN, H.: Unveröffentlicht
- 13 TERZAGHI, B. and SANDINE, W.: Appl. Microbiol., 29 (6), 807—813 (1975)
- 14 TERZAGHI, E. A. and TERZAGHI, B. E.: Appl. Microbiol., 35 (3), 471—478 (1978)
- 15 THEYERL, M., DEGLE, I. und BUSSE, M.: Dtsch. Mol. Ztg., 100 (26), 942—947 (1979)
- 16 WHITEHEAD, H. R. and HUNTER, G. J.: 12th Int. Dairy Congr., Vol. 2, 629—633 (1949)
- 17 ZOTTOIA, E. A. and MARTH, E. H.: J. Dairy Sci., 49 (11), 1338—1342 (1966)