



Phagenuntersuchung in CH-Milchwirtschaftsbetrieben

Ulrich ZEHNTNER, Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld (FAM), CH-3003 Bern

Seit 1986 bietet die FAM Phagenanalysen als Dienstleistung für den milchwirtschaftlichen Beratungsdienst an. Die Methoden wurden seither optimiert und konnten 1994 in einen akkreditierten Bereich eingebracht werden. Unsere Erfahrung zeigt, dass Phagen ursächlich an den meisten Säuerungsstörungen von Starterkulturen beteiligt sind. Die Anwesenheit von Phagen im Betrieb muss akzeptiert werden, nicht hingegen ihre massive Anreicherung. Normale Hygienemassnahmen und ein QS-Konzept bilden eine wirksame Barriere gegen betriebsinterne Phagenkreisläufe.

Bei Prozessen, in welchen bakterielle Kulturen eingesetzt werden, sind Phagen eine wesentliche Quelle für Fermentationsstörungen, was die Qualität des Endprodukts beeinträchtigt und eine oft länger dauern-

de Unsicherheit in die Prozessführung hineinbringt. Im gegenwärtigen Aufschwung von biologischen Technologien müssen finanziell schmerzhaft Erfahrungen mit diesen Viren gemacht werden. Kleinbetriebliche Käsereien sind mikrobiologisch gesehen offene Systeme. Parasiten kommen natürlicherweise dort vor, wo sich auch ihre Wirte vermehren. Von der Milchlieferantin, dem Betriebsmitarbeiter, der Kundin bis zum Kulturenher-

steller bringen alle Beteiligten potentiell Phagen in den Betrieb. Die wirksamste und damit risikoreichste Quelle ist aber die Käserei selbst, vor allem dann, wenn interne Kreisläufe ungewollt dafür sorgen, dass sich Phagen stufenweise anreichern können.

Phagen haben ein bestimmtes Wirtsspektrum. So befallen Phagen beispielsweise in deutschen oder französischen Käsereien andere Wirtsstämme als in Schweizer Käsereien. Sie werden mit einem Set von empfindlichen Indikatorstämmen nachgewiesen, das auf das jeweils eingesetzte Kultursortiment angepasst werden muss. In den Jahren 1986 bis 1990 wurden an der FAM die Nachweismethoden den Eigenheiten der hiesigen Stämme angepasst. Zwei Dissertationen (Schluep 1992; Greusing 1994) behandelten diverse Nach-

Was sind Bakteriophagen?

Bakteriophagen oder kurz Phagen sind kleine Viren, die Bakterien befallen und sich in ihnen parasitär vermehren. Ausserhalb ihrer Wirte überdauern sie ohne jede Aktivität in einer Proteinhülle, bis sie wieder auf einen passenden Wirtsstamm treffen und ihre Erbsubstanz in das Bakterium injizieren. Das Spektrum geeigneter Wirte ist sehr eng: Phagen, die sich beispielsweise auf *Lactobacillus delbrückii* vermehren, lysieren keine Streptokokkenphagen und umgekehrt. Das Wirtsspektrum ist sogar innerhalb einer Bakterienart noch auf bestimmte Stämme beschränkt, kann sich aber innerhalb von wenigen Generationen ändern.

Da die Phagen im Allgemeinen kürzere Generationszeiten aufweisen und wesentlich mehr Nachkommen produzieren als ihre Wirte, vermögen sie einen empfindlichen Wirtstamm in kurzer Zeit zu eliminieren. In der Natur haben beide gegenseitige Abwehrmechanismen eingebaut, die ein längerfristiges Überleben sichern. Beim - künstlichen - technischen Einsatz von grossen Mengen an bakteriellen Einzelstammkulturen kann es aber vorkommen, dass passende Phagen die ganze Kultur auflösen und auch folgende Kulturenanwendungen verunmöglichen, wenn sie nicht durch Reinigungsmassnahmen dezimiert werden oder auf resistente Kulturen treffen.

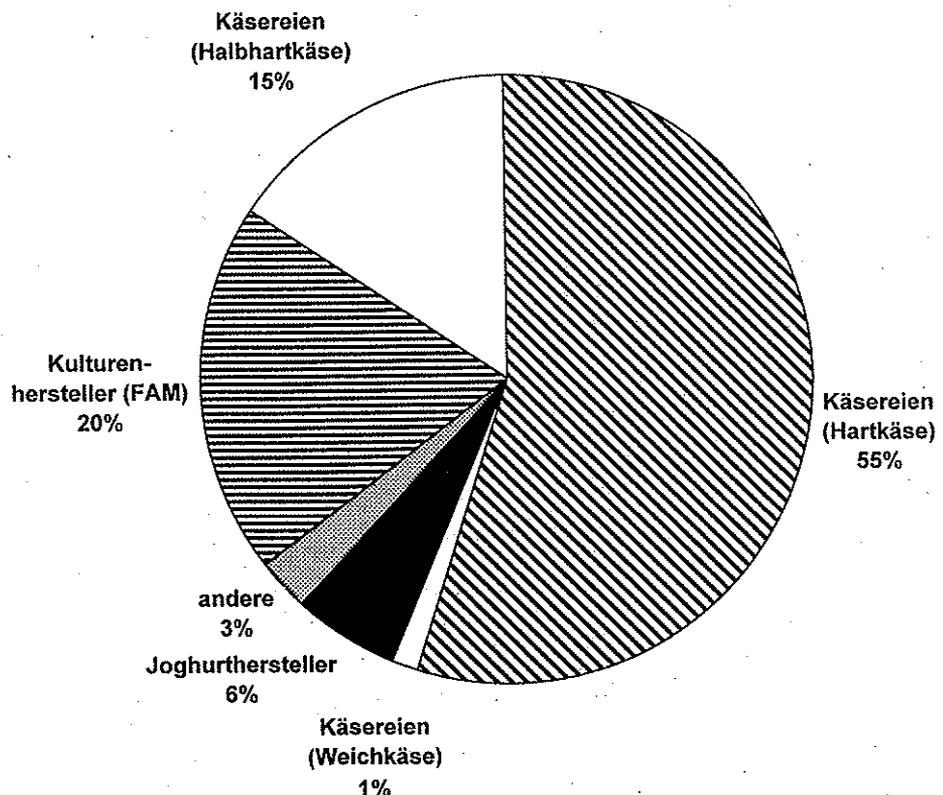


Abb. 1. Herkunft der Analysenaufträge.

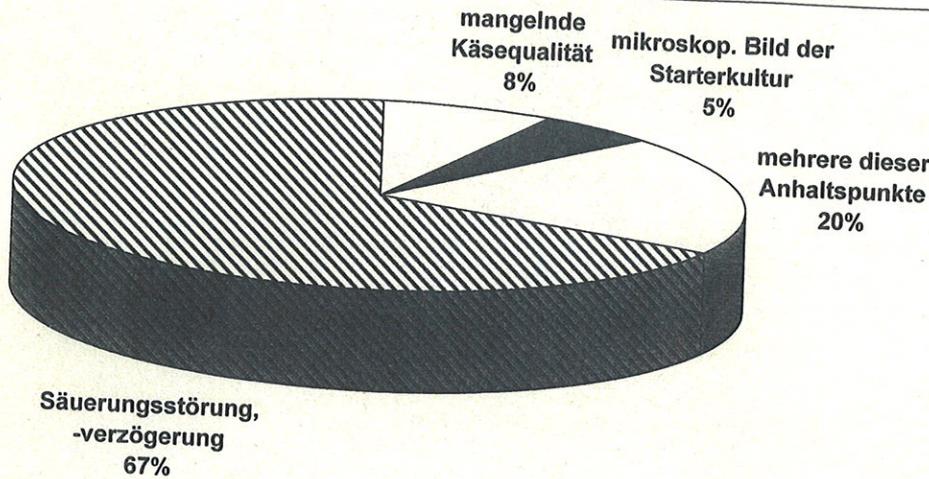


Abb. 2. Welche Beobachtungen in der Käserei führten zum Phagenverdacht?

weisprobleme und -optimierungen, so dass die Methoden 1994 akkreditiert werden konnten.

Säuerungsverzögerung als Hauptursache

In den zehn Berichtsjahren wurden über 70 Analysenaufträge entgegengenommen. Jeder Auftrag benötigt im Mittel etwa 14 Tage bis zum Abschluss. In Einzelfällen wurden wochenlange Folgeuntersuchungen durchgeführt. In der Praxis hat sich bewährt, dass ein vorgeschaltetes Beratungssystem dafür sorgt, dass nicht jede kurzfristige Säuerungsstörung in der Praxis gleich eine Phagenuntersuchung auslöst.

Drei Viertel der Aufträge kamen von kleinbetrieblichen Käsereien, wovon über die Hälfte aus dem Hartkäsesektor (Abb. 1). Dies widerspiegelt den Kundinnen- und Kundenkreis der FAM-Kulturen. 20 % der Aufträge stammen aus der FAM selbst. Hier führte die Zertifizierung in der Kulturenproduktion zu einem erhöhten Analysenbedarf, was die Qualitätssicherung der Versandkulturen verbesserte. Die hauptsächliche Ursache für einen Phagenverdacht und die Auslösung eines Nachweisauftrags liegt in beobachteten Säuerungsverzögerungen oder -zusammenbrüchen (Abb. 2). Mangelnde Käsequalität oder ein abweichendes Bild im Mikroskop reichten allein selten aus, um dahinter eine Phagenstörung zu vermuten. In der Regel musste zuerst eine Hemmstoffkontamination ausgeschlossen werden und die Säuerungsverzögerung mehrmals oder längere Zeit auftreten, um auf einen Phageneinfluss zu schließen. Wurde zusätzlich im Mikro-

skop beobachtet, dass in der Starterkultur die Streptokokken (Sc.) oder Laktobazillen (Lb.) massiv untervertreten waren, konnte der Phagenverdacht bekräftigt werden. Beim Vorliegen von mehreren Anhaltspunkten wurde bei jedem Analysenauftrag eine massive Phagenkontamination nachgewiesen, beim alleinigen Befund einer Säuerungsstörung betrug der Bestätigungsgrad immer noch 93 %. Einige Auftraggeber machten genauere Angaben zur Säuerungsstörung. War die Anfangssäuerung betroffen, wurden in der Tat meistens nur erhöhte Mengen von Sc.-Phagen nachgewiesen. Aus Betrieben mit Endsäuerungsproblemen wurden

interessanterweise nicht nur mehr Lb. Phagen, sondern gleichzeitig auch hohe Titer von Sc.-Phagen festgestellt. Die Abbildung 3 zeigt einen Vergleich zwischen dem Phagenvorkommen in Normalbetrieben (Greusing 1994) und in Problemetrieben, die auf Phagen untersucht wurden. Auffallend ist, dass Betriebe mit ungestörter Produktion und guter Qualität ebenso wenig phagenfrei sind wie Problemetriebe. Mit einem Unterschied: Aus Störfällen können dreimal mehr Sc.-Phagen nachgewiesen werden. Der Verlauf der Anfangssäuerung ist ein wichtiges Indiz für das Gärsgeschehen; Störungen werden schneller erkannt als im eintägigen Käse und führen zu Analysenaufträgen. Der hauptsächliche Unterschied zu Normalbetrieben ist aus der Grafik nicht ersichtlich: Die Konzentration der Phagen liegt beim Normalbetrieb typischerweise nahe der Nachweisgrenze um 100 Phagen/ml, aus Störfällen liegen jedoch fast immer Proben vor mit mindestens 10'000 Phagen/ml (häufig um 1 Mio. Phagen/ml, Maximum bei 100 Mio. Phagen/ml). Damit kann gezeigt werden, dass die Störung der Kulturenaktivität tatsächlich von den Phagen verursacht wird.

Stufenkontrollen decken Mängel auf

Die Analysen von Einzelproben (z.B. verdächtige Versandkulturen oder Betriebs-

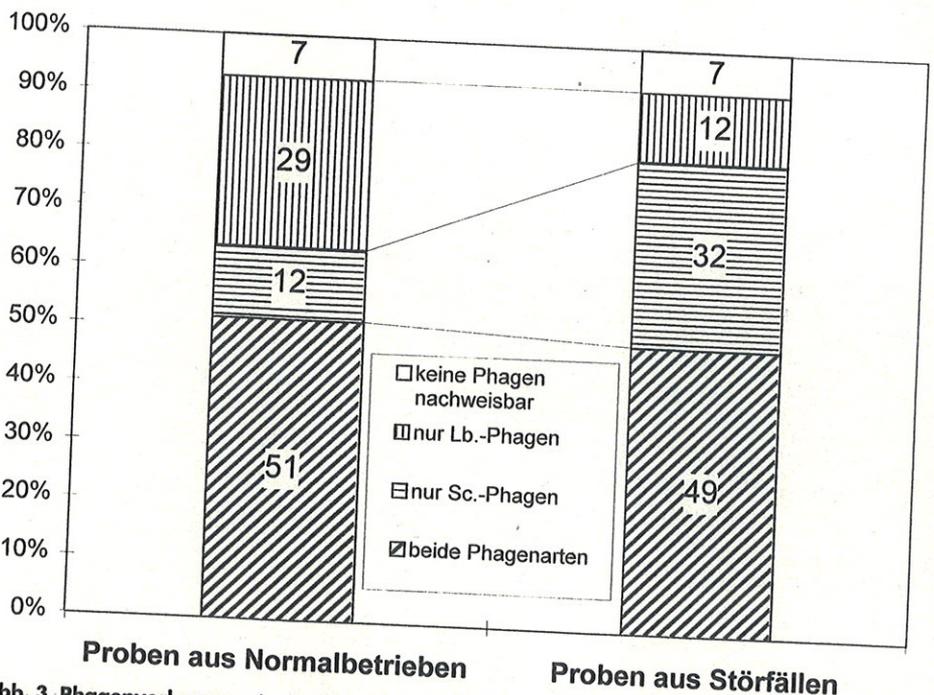


Abb. 3. Phagenvorkommen in der Käserei: Vergleich zwischen Normalbetrieben und Betrieben mit Phagenverdacht.

kulturen) sagten oft wenig zur betrieblichen Phagensituation aus. Um zuverlässig bestimmen zu können, in welchem Betriebsbereich Phagen massiv auftreten, wurden Stufenkontrollen empfohlen. Über die Hälfte aller Untersuchungen beruhen in der Tat auf Proben aus meist acht bis zwölf Produktionsstufen (z.B. Abendmilch, Kessimilch vor und nach dem Einlaben, Betriebskulturen, betriebseigene Proben wie «Gärprobe», «Labgärmolke», «Ausrührsirte», «Abtropfsirte», eintägiger Käse).

In keinem Fall konnte eine massive Phagenkontamination aus dem Bereich der Lieferantenmilch beziehungsweise der FAM-Kulturen festgestellt werden. Zu den Proben mit den tiefsten Phagentitern gehören: Abendmilch, FAM-Versandkultur, Betriebskultur, Kessimilch vor dem Einlaben. Bei den Betriebskulturen gibt es folgenschwere Ausnahmen: In mehreren Fällen gelangte offenbar bei der Herstellung genügend Phagenmaterial in die Betriebskulturen, um nach der Zugabe ins Kessi die Säuerung zu stören.

Zu den Proben mit den höchsten Phagentitern gehören die käsereiinternen Proben (Gärprobe, Labgärmolke, Ausrührsirte). Der Grund liegt darin, dass diese Proben über Nacht bebrütet werden und somit etwaigen Phagen eine zusätzliche Vermehrungsgelegenheit gegeben wird. Dies schränkt gleichzeitig die quantitative Aussagekraft über den ursprünglichen Phagentiter ein. Trotzdem ist dies eine wichtige Kontrolle: Zum einen zeigen sich so Phagen, die sich sonst unter der Nachweis-schwelle verbergen, zum ändern weisen Phagentiter von 10 Mio Phagen/ml und mehr anschaulich auf die potentiell verheerende Wirkung im jungen Käse hin. Regelmässig konnten Phagen in eher kleinen Mengen im 24-stündigen Käse festgestellt werden. Die Erfahrung hat gezeigt, dass nur etwa ein Prozent der Phagen in der Käsemasse bleibt. Der grosse Rest wird mit der Sirte weggeschwemmt. Hier zeigt sich ein weiteres Risiko: Wird die Schotte im Tank nicht genügend erhitzt, kann über Bodenverunreinigungen ein Teil der Phagen wieder zurück in den Betriebsraum gelangen.

Vier Untersuchungen betrafen Nachkontrollen nach Sanierungen (auch aufgrund von Phagenstörungen). In drei Fällen war der Phagentiter auf allen Stufen wesentlich gesunken. Damit bestätigte sich, dass Hygienemassnahmen auch ein Mittel gegen Phagenprobleme darstellen. Es braucht keine zusätzliche, aufwendige «Phagenhygiene», der normale QS-Rah-

men reicht. Dies kann man auch umgekehrt sehen: Ein Betrieb mit deutlichen Hygieneproblemen wird über kurz oder lang auch ein Phagenproblem bekommen.

Nach Auskunft des FAM-Beratungsdienstes haben sich folgende Massnahmen bewährt:

- Einhalten von genügend langen Einwirkungszeiten von Hitze, Säure und Lauge bei der Gerätereinigung (Unterbrechung von Phagenkreisläufen);
- Bezug von kreislaufunabhängigen Starterkulturen (Unterbrechung von Phagenkreisläufen);
- Trennung der Betriebskulturenherstellung (Milchvorbereitung, Beimpfung, Bebrütung) vom Produktionsraum (Reduktion der Phagenkontamination);
- Ausstattung des Produktions- und Salzbadraums mit Böden und Wänden, die sich für eine intensive und häufige nasse Reinigung und Trocknung eignen (Reduktion der Phagenkontamination und Unterbrechung von Phagenkreisläufen);
- Vermeidung von langen Phasen der Dampf- und Kondensatbildung im Fabrikationsraum, Reduktion der relativen Feuchte (Unterbrechung von Phagenkreisläufen über die Luft);
- Genügend hohe und lange Erhitzung der Tankschotte, sorgfältiges Abfüllen der Rückgabeschotte ohne Verspritzen (Vermeidung von Phagenkreisläufen)

LITERATUR

- Greusing M., 1994. Die Verbreitung und Bedeutung von Milchsäurebakterien-Phagen in schweizerischen Rohmilchkäsereien. Diss. Med. Fak. Uni Bern.
- Schluep K., 1992. Kritische Bewertung und Optimierung der Spot- und Plaque- sowie der MPN-Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Phagen thermophiler Laktobazillen. Diss. Nr. 9949, ETH Zürich.

RÉSUMÉ

Analyse des phages dans les fromageries et laiteries suisses, 1986 - 1996

Depuis 1986, la FAM offre comme prestation aux services de consultation en matière d'économie laitière des analyses de phages. Les méthodes appliquées dans ce but ont été optimisées et sont désormais intégrées, depuis 1994, dans un domaine accrédité. Notre expérience montre que les phages participent à la plupart des troubles d'acidification des levains. Certes, il faut tolérer la présence des phages dans les

exploitations, mais non leur multiplication massive. Pour lutter efficacement contre ce fléau, il suffit d'appliquer des mesures d'hygiène normales et de mettre en place un concept d'assurance qualité.

SUMMARY

Phage analysis in Swiss dairy plants 1986 - 1996

Since 1986, the FAM offers to the consultant services the possibility to have phages analysed. Methods used for this purpose have been optimised and are, since 1994, integrated in an accredited field. Our experiments have shown that phages participate in most of the starter acidification failures. Although phages have to be tolerated in dairy factories, their massive multiplication has to be efficiently fought. To do so, it is necessary to apply normal hygienic measures and to introduce a quality assurance concept.

KEY WORDS: bacteriophage, acidification failure, quality assurance concept