

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Isolierung von Milchsäurebakterien mit hemmender
Wirkung gegenüber Euterpathogenen und
orientierende Untersuchungen zur intramammären
Anwendung an der bovinen Milchdrüse**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer Doktorin
der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Ann-Christin Diepers
Geldern

Hannover 2017

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Volker Krömker;
Hochschule Hannover, Fakultät II,
Abteilung Bioverfahrenstechnik – Mikrobiologie;

1. Gutachter: Prof. Dr. Volker Krömker

2. Gutachter: Prof. Dr. Manfred Kietzmann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2017

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits auf folgenden Tagungen und in folgenden Journalen vorgestellt:

Ann-Christin Diepers, Volker Krömker, Claudia Zinke, Nicole Wente, Liying Pan, Kathrin Paulsen und Jan-Hendrik Paduch

Milchsäurebakterien – Untersuchung hemmender Eigenschaften gegenüber euterpathogenen Mikroorganismen *in-vitro*

Vortrag auf dem Seminar „Mastitisnachmittag der Hochschule Hannover“, Hannover, 01. April 2016

Ann-Christin Diepers, Volker Krömker, Claudia Zinke, Nicole Wente, Liying Pan, Kathrin Paulsen und Jan-Hendrik Paduch

***In-vitro* ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens**

(*In-vitro* Hemmfähigkeit von Milchsäurebakterien gegenüber Euterpathogenen)

Sustainable Chemistry and Pharmacy (2016),

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scp.2016.06.002>

veröffentlicht am 02.Juni 2016

Ann-Christin Diepers, Jan-Hendrik Paduch und Volker Krömker

Milchsäurebakterien – Entwicklung eines innovativen Therapeutikums zur lokalen Mastitistherapie

Vortrag auf der 42. Leipziger Fortbildungsveranstaltung „Labordiagnostik in der Bestandsbetreuung“, Leipzig, 16. Juni 2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Literaturübersicht	13
2.1	Mastitis des Rindes	13
2.1.1	Definition und Pathogenese	13
2.1.2	Einteilung der Mastitiden	14
2.1.3	Euterpathogene Mikroorganismen	15
2.1.4	Therapeutische Maßnahmen	16
2.2	Milchsäurebakterien	18
2.2.1	Taxonomische Einteilung und Physiologie der Milchsäurebakterien	19
2.2.2	Antimikrobielle Eigenschaften von Milchsäurebakterien	20
2.2.3	Einsatz von Milchsäurebakterien in der Lebensmittelproduktion und Medizin	21
2.2.4	Bakteriozine: <i>in-vitro</i> und <i>in-vivo</i> Untersuchungen	23
2.2.5	Hemmende Eigenschaften lebender Milchsäurebakterien: <i>in-vitro</i> und <i>in-vivo</i> Untersuchungen	25
3	Material und Methoden	27
3.1	Teil I: Isolierung und Charakterisierung von Milchsäurebakterien aus dem Umfeld des Rindes	27
3.1.1	Betriebe und Probennahme	27
3.1.2	Isolierung der Milchsäurebakterien	28
3.1.3	Antimikrobielle Aktivität / Well-Diffusions-Test	28
3.1.4	Biochemische und genetische Speziesidentifikation	30
3.1.5	Adhäsion an bovine Zitzenkanal-Epithelzellen	31
3.1.6	Hämolysinproduktion und antibiotische Resistenz der Milchsäurebakterienstämme	32
3.1.7	Wachstum in Milch	34

3.2 Teil II: Orientierende Untersuchungen der Gewebeverträglichkeit, Etablierung und Immunantwort nach intramammärer Infusion von <i>Lb. plantarum</i> 118/37 in die bovine Milchdrüse	34
3.2.1 Auswahl des Milchsäurebakterienstamms und Herstellung einer konservierbaren Applikationsform der Lebendkultur	34
3.2.2 Betriebe und Tiere.....	35
3.2.3 Behandlungsprotokoll.....	36
3.2.4 Probenentnahme.....	38
3.2.5 Bakteriologische Untersuchung und Zellzahlbestimmung.....	38
3.2.6 Differenzierung und Zählung der somatischen Zellen	39
3.2.7 Nachweis von <i>Lb. plantarum</i> 118/37 aus Milchproben mittels RAPD- PCR	39
4 Publication I: <i>In-vitro</i> ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens.....	41
4.1 Abstract	42
5 zur Publikation vorbereitetes Manuskript: Initial assessment of tissue tolerability, duration of detectability and immune response after an intramammary infusion of <i>Lb. plantarum</i>	43
5.1 Abstract	43
5.2 Introduction.....	44
5.3 Material & Methods	46
5.3.1 Selection of the LAB strain and Preparation of live culture treatment	46
5.3.2 Selection of animals	47
5.3.3 Treatment protocol (clinical observations and animal care)	48
5.3.4 Milk sampling protocol.....	49
5.3.5 Microbiological assessment and somatic cell count.....	49
5.3.6 Analysis and differentiation of somatic cells present in milk.....	50
5.3.7 Detection of <i>Lb. plantarum</i> 118/37 in milk samples with RAPD-PCR.....	50
5.4 Results	51

5.4.1 Tissue tolerability test: clinical observations, SCC response and microbiological development in cows 193, 475 and 312	51
5.4.2 Dose determination study: clinical observations, SCC response and microbiological development in cows 108, 97 and 513	52
5.5 Discussion	53
5.6 Conclusion	58
5.7 Acknowledgements	58
5.8 Conflict of Interest	58
5.9 References	58
5.10 Appendix	63
6 Diskussion.....	68
6.1 Isolierung von Milchsäurebakterien.....	68
6.2 Prüfung auf antimikrobielle Eigenschaften	69
6.3 Prüfung probiotischer Eigenschaften	71
6.4 Applikationsmatrix	75
6.5 Gewebeverträglichkeit.....	76
6.6 Dosisfindung	78
7 Zusammenfassung.....	83
8 Summary.....	86
9 Literaturverzeichnis	89
10 Danksagung.....	105

1 Einleitung

Die Milchproduktion ist ein bedeutender Wirtschaftszweig in der deutschen Landwirtschaft. Im Jahr 2014 lag die Jahresproduktion von Rohmilch bei 32,4 Mio. t mit einem Produktionswert zu Erzeugerpreisen von 12,7 Mrd. € (BMEL 2016, 2015). Deutschland stellt mit 4,2 Mio. Milchkühen und einer durchschnittlichen Jahresleistung von 7700 kg / Kuh (2016) im europäischen Vergleich das erzeugungsstärkste Land in der Milchproduktion dar (Milchindustrie-Verband e.V. 2016). Nach Wegfall der Milchquotenregelung im April 2015 und den damit einhergehenden Preisschwankungen am Milchmarkt ist es für die moderne Milchwirtschaft noch bedeutsamer geworden, durch gesunde, leistungsstarke Tiere eine effektive und gewinnbringende Milchproduktion zu gewährleisten. Neben dieser erforderlichen Produktivität hat außerdem der Aspekt der Nachhaltigkeit in den letzten Jahren enorm an Relevanz gewonnen. Eine tiergerechte, ressourcenschonende und ökonomische Produktion des Lebensmittels Milch kann somit nicht nur die Akzeptanz des Verbrauchers, sondern auch die Motivation der Produzenten sichern.

Eine der häufigsten Erkrankungen der Milchkuh und damit eine Gefährdung der Produktivität und des Wohlbefindens der Tiere ist die Mastitis (Bradley 2002, Seegers et al. 2003). Die entzündliche Veränderung der Milchdrüse hat immensen Einfluss auf die Wirtschaftlichkeit. Dies wird besonders deutlich, wenn neben den hohen Inzidenzen die entstehenden Kosten betrachtet werden. Der internationale Milchwirtschaftsverband (IDF) beziffert die ökonomischen Verluste pro klinischer Mastitis durch Milchleistungseinbußen, Verlust der Hemmstoffmilch, Mehraufwand, Behandlungskosten und höhere Remontierungsraten auf 253 bis 270 € (IDF 2005). Steeneveld et al. (2011) untersuchten die Kosten klinischer Mastitiden im Hinblick auf fünf unterschiedliche Behandlungsstrategien. Die durchschnittliche Kostenbelastung wurde hier auf 224 bis 275 \$ geschätzt.

In der modernen Milchviehhaltung werden durch präventive Maßnahmen, wie der Verbesserung der Hygiene im Liegeboxen-, Laufgang- und Melkbereich, Anpassung der jeweiligen Futterrationen, Optimierung der Melktechnik, Erweiterung der Diagnostik und einer gezielten Separierung infizierter Tiere, Wege gesucht, das Risiko

einer Neuinfektion in Laktation und Trockenperiode zu minimieren. Kommt es allerdings doch zu einem Mastitisfall, sind die Behandlungsmöglichkeiten begrenzt und stützen sich meist auf die Anwendung antibiotischer Formulierungen (Merle et al. 2013, Santman-Berends et al. 2015).

In den letzten Jahren wurden die Bedenken und Kritiken an einem Gebrauch antibiotischer Präparate bei der Produktion tierischer Lebensmittel immer größer. Neben den ökonomischen Nachteilen einer antibiotischen Behandlung rückt der Vorwurf einer erhöhten Resistenzentwicklungswahrscheinlichkeit autochthoner und allochthoner Mikroorganismen immer mehr in den Mittelpunkt der Kritik. Die zunehmende Diskussion in der Gesellschaft über den Einsatz antibiotischer Arzneimittel in der Nutztierhaltung und der damit einhergehende erhöhte Druck auf die Politik führten im Jahr 2014 mit der 16. Novelle des Arzneimittelgesetzes zu einer verschärften Informationsregelung (BVL 2014). Die neue Regelung nimmt nicht nur die pharmazeutischen Unternehmen und Großhändler in die Pflicht, die Gesamtmenge der an Tierarztpraxen abgegebenen Antibiotika zu melden, sondern auch die Halter von Masttieren, welche nun verpflichtet sind, die Art und Menge der angewendeten Arzneimittel zu dokumentieren (§ 58b AMG). Durch überregionale Vergleiche können zudem Durchschnittswerte ermittelt werden, welche bei Überschreitung die Halter in die Pflicht nehmen Maßnahmen zur Senkung des Antibiotikaeinsatzes zu etablieren. Zwar gilt diese Überwachungsmaßnahme bislang nur für Tiere, die für die Mast vorgesehen sind, allerdings ist davon auszugehen, dass in Zukunft auch für die Milcherzeugung schärfere Auflagen geschaffen werden.

Diese Aspekte verdeutlichen, dass neben einer weiteren Ausdehnung präventiver Maßnahmen auch die Suche nach alternativen, nachhaltigen Therapiemethoden immer bedeutsamer wird. Eine Verbesserung hinsichtlich ökonomischer, ethischer und nachhaltiger Gesichtspunkte kann das Wohlergehen der Tiere, der Erzeuger und letztlich der Verbraucher steigern und somit einen Beitrag zur zukünftigen Akzeptanz der Nutztierhaltung in der Gesellschaft leisten. Alternativen zur konventionellen antibiotischen Therapie, beispielsweise der Einsatz anderer antimikrobiell wirksamer Substanzen, wie Laktoferrinen, Bakteriozinen, Enzymen und Bakteriophagen, oder die Aktivierung des Immunsystems durch Zytokine oder Impfungen werden vermehrt

erforscht (Alluwaimi 2004, Broadbent et al. 1989, Diarra et al. 2003, Middleton et al. 2009, Oldham und Daley 1991, Wedlock et al. 2008).

Eine Kombination aus antimikrobieller Wirkung und Immunmodulation könnte der Einsatz von probiotischen Bakterien darstellen. Zu diesen Probiotika zählt auch die Gruppe der Milchsäurebakterien, die größtenteils als GRAS (generally recognized as safe) eingestuft und in vielen Bereichen der Lebensmittelproduktion (Aromabildung, hygienische Sicherung, Haltbarkeitsverlängerung) eingesetzt werden (Erkkila 2001, Morgan et al. 1997, Stiles und Holzapfel 1997). Milchsäurebakterien kommen im natürlichen Umfeld der Milchkuh vor und können von Pflanzen und aus Futtermitteln, aus Einstreumaterial, von Zitzenepithelien oder aus der Milch isoliert werden (Chaimanee et al. 2009, Espeche et al. 2009). Die Herabsetzung des pH-Wertes durch den Abbau von Laktose zu Laktat und die Sezernierung antimikrobieller Substanzen stellen die wichtigsten hemmenden Mechanismen der Milchsäurebakterien auf das Wachstum anderer Mikroorganismen dar (Holzapfel und Wood 2014, S. 45-47). Darüber hinaus werden sie als Aktivator einer gesteigerten, lokalen Immunantwort nach Verbringen in die Milchdrüse angesehen (Beecher et al. 2009, Crispie et al. 2008).

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden diese Mikroorganismen vermehrt auf ihre hemmende Wirkung gegenüber anderen, potenziell pathogenen Mikroorganismen untersucht (Millette et al. 2007, Nader-Macías et al. 2008, Otero und Nader-Macías 2006, Soleimani et al. 2010). In *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen konnte der hemmende Einfluss von durch Milchsäurebakterien gebildeten Bakteriozinen wie beispielsweise Nisin oder Lacticin 3147 gezeigt werden (Cao et al. 2007, Ryan et al. 1999, Wu et al. 2007). Für die Verwendung im Rahmen einer Mastitisbehandlung ist außerdem ihre Fähigkeit, an Epithelien anzuhaften und diese zu kolonisieren, von besonderem Interesse. Damit stellen sie einen Nährstoff- und Ansiedlungskonkurrenten für andere Mikroorganismen dar (Crispie et al. 2008, Frola et al. 2012a).

Die Antwort des Immunsystems auf diese Mikroorganismen scheint einen weiteren wichtigen Mechanismus zur Eliminierung pathogener Keime darzustellen. Jüngere Arbeiten zeigen, dass das Verbringen von Gram-positiven Bakterien in die bovine

Milchdrüse eine deutliche Immunantwort auslöst. Diese äußert sich durch einen kurzzeitigen Anstieg des Gehaltes somatischer Zellen in der Milch mit einer histologisch nachweisbaren Rekrutierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und einer gesteigerten Genexpression Zytokin-kodierender Gene. Dies hat eine Reduzierung und Elimination der pathogenen Keime zur Folge (Beecher et al. 2009, Crispie et al. 2008, Foligne et al. 2007, Frola et al. 2012b). In klinischen Untersuchungen konnten Klostermann et al. (2008) und Nagahata et al. (2015) demonstrieren, dass eine Behandlung mit probiotischen Lebendkulturen einen vergleichbaren Effekt auf die klinische Heilungsrate hat wie antibiotische Therapien. Ziel dieser Arbeit ist es, Milchsäurebakterien auf ihre antimikrobielle Wirkung und Eignung für eine Anwendung am Euter zu prüfen, um zur Entwicklung eines alternativen Therapeutikums zur Behandlung boviner Mastitiden beizutragen. Hierdurch ergaben sich zwei Arbeitsschwerpunkte:

In einem ersten Teil der Arbeit wurden zunächst Milchsäurebakterien aus der bovinen Umwelt isoliert und charakterisiert. In *in-vitro* Untersuchungen wurden diese dann auf ihre Hemmfähigkeit gegenüber ausgewählten euterpathogenen Mikroorganismen und auf ihre Eignung für eine potenzielle Applikation in die bovine Milchdrüse untersucht. Die Ergebnisse dieses Screenings wurden in einer Publikation präsentiert und diskutiert (Kapitel 4).

In einem zweiten Arbeitsschwerpunkt wurde, im Hinblick auf eine mögliche Anwendung als Therapeutikum, eine Methode zur dauerhaften Lagerung dieser lebenden Mikroorganismen erarbeitet, welche eine schnelle Aktivierung und Verabreichung der Lebendkultur ermöglicht. Zudem wurden in einem Feldversuch die Gewebeverträglichkeit und die Auswirkungen auf das Immunsystem klinisch gesunder Milchkühe nach einmaliger Applikation untersucht. Zur Bestimmung einer geeigneten Dosierung wurde bei weiteren Tieren die klinischen und immunologischen Reaktionen nach Verbringen drei verschiedener Bakterienkonzentrationen bestimmt. In beiden Tierversuchen wurde gleichzeitig die Dauer der Nachweisbarkeit der Milchsäurebakterien aus den gewonnenen Milchproben geprüft. Den Abschluss dieser Arbeit soll auch hier eine Publikation bilden, welche die Verträglichkeit und die Etablierung der Milchsäurebakterien diskutiert (Kapitel 5).

2 Literaturübersicht

2.1 Mastitis des Rindes

2.1.1 Definition und Pathogenese

Die entzündliche Reaktion der Milchdrüse wird als Mastitis bezeichnet (IDF 1987). Diese Erkrankung kann von einer sensorischen Beeinträchtigung des Milchsekretes über eine entzündliche Veränderung des Eutergewebes bis hin zu Störungen des Allgemeinbefindens reichen (DVG 2012). Dabei stellen Mastitiden in ihrer Gesamtheit eine Faktorenkrankheit dar, da ihre Entstehung neben dem verursachenden infektiösen, toxischen oder traumatischen Agens auch von der lokalen und systemischen Immunabwehr des Tieres abhängt (Hamann 2005). Diese wiederum wird stark von Haltung und Fütterung der Tiere beeinflusst (DVG 2012, IDF 2011).

Über die mittlere Inzidenz dieser Erkrankung liegen wenige Studien vor. Santman-Berends et al. (2015) ermitteln 32,5 klinische Mastitisfälle pro 100 Kühe und Jahr in einer Untersuchung von 227 niederländischen Milchviehbetrieben. Eine noch unveröffentlichte Auswertung von Daten aus 158 west- und ostdeutschen Milchviehbetrieben im Jahr 2014 der Arbeitsgruppe Mikrobiologie unter Leitung von Prof. Dr. Volker Krömker der Hochschule Hannover zeigt eine mittlere Inzidenz klinischer Mastitiden von 47 Fällen pro 100 Kühe und Jahr. Die Inzidenz ist abhängig von der Exposition zu pathogenen Keimen, der Effektivität der Immunabwehr und der Präsenz von umweltbedingten Risikofaktoren in Form von haltungsbedingten und hygienischen Mängeln. Bei Beeinträchtigung des Gewebes durch Zitzenkonditionsstörungen oder Zitzenverletzungen wird das Eindringen pathogener Mikroorganismen entweder während des Melkvorganges oder in der Zwischenmelkzeit durch den Zitzenkanal in die Milchdrüse erleichtert (DVG 2012, Krömker 2007, S. 48–49, Nielsen 2009). Bei Schwächung der allgemeinen und lokalen Immunabwehr durch Stressoren wie Geburt, Futterumstellung, unausgewogene Rationen oder Erkrankungen mit immunsuppressivem Charakter können sich die Erreger dann verstärkt im Drüsengewebe vermehren und schädliche Toxine oder Enzyme bilden. Die hervorgerufene Gewebeschädigung führt zu einer erhöhten

vaskulären Permeabilität, welche die Zusammensetzung des Milchsekretes verändert. Die Anteile von Blutbestandteilen wie Serumproteine und Enzyme erhöht sich und die Synthese von Kasein und Laktose wird herabgesetzt (IDF 1987, Nielsen 2009). Auch die Fettzusammensetzung und der Gehalt an Mineral-Ionen verändert sich, was eine Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit bedingt. Die Anzahl somatischer Zellen in der Milch ist aber der zumeist herangezogene Entzündungsparameter. Als somatische Zellen werden körpereigene Abwehrzellen, wie polymorphkernige neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten und Gewebezellen wie Epithelzellen bezeichnet (Krömker 2007, S. 51). In der Milch eines gesunden Euters werden hauptsächlich Makrophagen als Vertreter der weißen Blutzellen gefunden. Bei einer Infektionsabwehr des Euters im Mastitisfall kommt es zu einem rapiden Anstieg der Zahl der somatischen Zellen, und die Zellzusammensetzung verändert sich zu Gunsten der neutrophilen Granulozyten (Harmon 1994, Kehrlı und Shuster 1994). Als physiologischer Normalbereich werden laut aktuellem wissenschaftlichen Kenntnisstand Zellgehalte von ca. 50.000 bis 70.000 Zellen / ml Milch definiert (Djabri et al. 2002, Laevens et al. 1997, Seegers et al. 2003). Zum jetzigen Zeitpunkt gelten Euterviertel als gesund, wenn die somatische Zellzahl in der Viertelgemelksprobe unter 100.000 Zellen / ml liegt (DVG 2012). Bei Überschreiten dieses Zellgehaltes wird von einer Mastitis gesprochen. Ein möglicher Erregernachweis hilft, diese weiter zu spezifizieren.

2.1.2 Einteilung der Mastitiden

Eine Mastitis kann klinisch oder subklinisch verlaufen. Bei einer klinischen Mastitis können Entzündungssymptome (Rubor, Dolor, Calor, Tumor und Functio laesa) festgestellt werden. Zur Schaffung einer einheitlichen, praktikablen Definition und zur Erleichterung der Therapieentscheidung werden klinische Mastitiden häufig in drei Schweregrade eingeteilt. Bei milden Fällen ersten Grades sind lediglich makroskopische Veränderungen im Milchsekret in Form von Flocken, Viskositäts- und Farbabweichungen feststellbar. Bei einer Mastitis zweiten Grades werden zusätzlich zu der abnormalen Sekretion Erwärmung, Schwellung, Schmerzhaftigkeit und Rötung des Eutergewebes festgestellt. Bei schweren Fällen dritten Grades kommt es zu einer

systemischen Reaktion, die sich in einem gestörten Allgemeinbefinden mit Fieber, Appetitlosigkeit und / oder Dehydratation äußert (IDF 1999).

Bei der subklinischen Mastitis bleiben diese Entzündungssymptome aus. Die Diagnose kann nur durch eine Bestimmung des Zellzahlgehaltes getroffen werden (Van den Borne 2010). Da eine mikrobiologische Untersuchung selten routinemäßig durchgeführt wird, bleibt diese Form der Mastitis oft unerkannt. Nichtsdestotrotz vermindert die subklinische Mastitis die Milchleistung, birgt außerdem das Risiko bei weiteren negativen Einflüssen in eine klinische Mastitis überzugehen und wird, vor allem in der Laktation, als schwer heilbar eingestuft (Deluyker et al. 2005, DVG 2012, Halasa et al. 2007, Linder et al. 2013).

Die Dauer der Erkrankung klassifiziert die Mastitis als akut oder chronisch. Ein plötzliches Auftreten klinischer Erkrankungssymptome wird als akutes Geschehen angesehen, wohingegen eine chronische Entzündung einen über mehrere Wochen oder Monate andauernden Prozess beschreibt, der häufig eine Fibrosierung des Gewebes zur Folge hat (IDF 1987).

2.1.3 Euterpathogene Mikroorganismen

Zur Kategorisierung der Milchdrüsenerkrankung wird bei der Milchprobenuntersuchung neben dem Parameter Zellgehalt auch der Nachweis von euterpathogenen Mikroorganismen herangezogen (DVG 2012). Die klassische Einteilung der Euterpathogene unterscheidet zwischen kuhassozierten und umweltassozierten Erregern (IDF 2011). Kuhassozierte Mastitiserreger werden auch als kontagiöse Erreger bezeichnet und sind auf der Zitze oder im Drüsengewebe der Milchkuh zu finden. Sie haben eine starke Ausbreitungstendenz und sind oft für ein subklinisches Krankheitsgeschehen in der Milchviehherde verantwortlich, was sich in einer erhöhten Zellzahl in der Tankmilchprobe und niedrigeren Milchleistungen äußern kann. Kuhassozierte Erreger werden vor allem während des Melkvorgangs durch das Melkzeug oder andere Vektoren wie Melkerhände übertragen. Zu dieser Gruppe der Erreger zählen *Staphylococcus (S.) aureus*, *Streptococcus (Sc.) agalactiae*, *Sc. dysgalactiae* und Mykoplasmen. Zu den umweltassozierten Mikroorganismen zählen *Sc. uberis*, *Enterococcus* spp. und *Escherichia (E.) coli*, welche vor allem aus der

Einstreu und im Liege- und Laufbereich isoliert werden können und ihren Hauptübertragungszeitpunkt in der Zwischenmelkzeit haben. Umweltassoziierte Erreger zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht an den Wirt adaptiert sind. Bei hohem Keimdruck und einer mangelnden Abwehrsituation kommt es zwar zur Einwanderung und Vermehrung dieser Mikroorganismen, allerdings werden sie schnell vom Immunsystem erkannt und eliminiert. So kommt es, dass circa 50 % der Umweltmastitiden selbstlimitierend sind und ohne Therapie ausheilen können (Krömker 2007, S. 58-60, Mansion-de Vries 2016). Als eine weitere Gruppe sind die auf der Zitzenhaut der Kuh vorkommenden Mikroorganismen zu nennen. Dies sind neben coryneformen Bakterien die Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS), zu welchen *S. epidermidis* und *S. xylosus* gehören (Krömker 2007, S. 60). Ihre pathogene Wirkung gilt als sehr variabel, so dass sie bei 9-41% der subklinischen, intramammären Infektionen nachgewiesen werden können (Piepers et al. 2007, Sampimon et al. 2009, Tenhagen et al. 2006).

In den letzten Jahrzehnten hat sich das ermittelte Keimspektrum bei Mastitiden gewandelt. Die weite Verbreitung von kuhassoziierten Erregern konnte durch Sanierungsprogramme, antibiotisches Trockenstellen und verbesserte Melkhygiene weitgehend reduziert werden, so dass, neben einer zunehmenden Tendenz an Viertelgemelksproben ohne Erregernachweis, vor allem umweltassoziierte Keime und opportunistische Hautbesiedler vermehrt nachgewiesen werden (Krömker 2009, Tenhagen et al. 2006).

2.1.4 Therapeutische Maßnahmen

Tritt eine Mastitis in der Laktation auf, wird der Behandlungserfolg maßgeblich durch die Gesamtsituation des zu behandelnden Tieres und den Zeitabstand zwischen Erkrankungs- und Therapiebeginn bestimmt (Barkema et al. 2006). Da es sich meist um eine bakterielle Infektion handelt, werden in der Standard-Mastitistherapie lokal wirksame, antibiotische Präparate verwendet. Je nach pathogenem Erreger und Resistenzsituation kann hierfür der geeignete Wirkstoff gewählt werden. Bei einem klinischen Mastitisfall wird eine Therapie meist sofort eingeleitet (vgl. Kapitel 2.1.2). Dies bedeutet, dass das Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung, welches circa

zwei Tage nach Beginn der Untersuchung feststeht, lediglich zur Überprüfung bzw. zur Korrektur der eingeleiteten Therapie verwendet werden kann (Krömker und Friedrich 2011). Um trotzdem ein erfolgreiches Behandlungsergebnis zu erzielen, werden deshalb oft Präparate eingesetzt, die ein breites Wirkungsspektrum aufweisen (Pol und Ruegg 2007, Saini et al. 2012).

Therapeutischer Erfolg kann zum einen an klinischer Heilung gemessen werden, welche erreicht wird, wenn die klinischen Symptome am Eutergewebe verschwunden sind und der Milchcharakter wiederhergestellt ist. Durch die Entnahme und mikrobiologische Untersuchung von Viertelgemelksproben vor und nach der Mastitistherapie kann zum anderen die bakteriologische Heilung bestimmt werden. Sie tritt ein, wenn der Erreger, der bei Beginn der Mastitis isoliert wurde, bis zu einer festgelegten Zeit nach Therapieende nicht mehr nachgewiesen wird. Da nach einer Mastitisbehandlung aus praktischen und ökonomischen Gründen oft nur die klinische Heilung beurteilt wird, besteht die Möglichkeit, dass es zu einer unvollständigen Erregerelimination kommt und eine klinische Mastitis in eine subklinische übergeht (Pol und Ruegg 2007). Dies kann zu einer erhöhten Rezidivrate führen. Circa 40% der Rezidive sind auf eine fehlende bakteriologische Heilung zurückzuführen (Hillerton und Kliem 2002). Ein Drittel der betroffenen Tiere bzw. 10% der betroffenen Euterviertel erkranken in einer Laktation mehrfach (Grieger et al. 2014). Die Heilungswahrscheinlichkeit für diese Rezidive fällt deutlich geringer aus. Pinzón-Sánchez und Ruegg (2011) berichten von einer 7-fach höheren Heilungswahrscheinlichkeit bei Erstauftreten einer Mastitis als bei einem Rezidivfall.

In der Diskussion um eine Rechtfertigung einer antibiotischen Therapie wird neben den ökonomischen Verlusten durch Arzneimittelkosten und Verlust der Hemmstoffmilch auch eine unzureichende Effizienz, vor allem im Hinblick auf subklinische Mastitiden und bakteriologische Heilung, bemängelt. Barkema et al. (2006) und Swinkels et al. (2005) berichten zwar von einer Reduktion der Infektionsübertragung von *S. aureus* durch eine antibiotische Behandlung, halten diese aber nur für sinnvoll, wenn es sich um ein akutes Krankheitsgeschehen bei jungen Tieren mit sensiblen Stämmen handelt. Sandgren et al. (2008) konnten keine

signifikanten Langzeiteffekte einer antibiotischen Therapie subklinischer Mastitiden während der Laktation auf Milchleistung oder Neuinfektionsrate erkennen.

Kritisch erscheint außerdem die erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung der pathogenen und natürlich vorkommenden Mikroorganismen durch eine antibiotische Therapie (Mevius et al. 2005, Verraes et al. 2013, White und McDermott 2001). Die befürchtete Übertragung dieser Resistenzen auf mögliche Humanpathogene durch direkten Kontakt mit den Tieren oder durch den Verzehr von Lebensmitteln behandelter Tiere führte unlängst zu kontroversen Diskussionen und Restriktionsforderungen durch Politik und Medien.

Alternativen zur konventionellen, antibiotischen Therapie zielen einerseits auf eine generelle Keimreduzierung durch den Einsatz alternativer, antimikrobiell wirksamer Substanzen ab. Beispiele hierfür sind Bakteriozine (Gillor et al. 2009, Lewus und Montville 1991, Parada et al. 2007, Pieterse und Todorov 2010a), Enzyme (Oldham und Daley 1991, Sears et al. 1992b), Bakteriophagen (Gill et al. 2006) oder andere antimikrobiell wirksame Peptide (Volzing et al. 2012). Weitere Überlegungen verfolgen das Ziel, die körpereigene Abwehr stärker in den Therapieprozess einzubeziehen. Beispielgebend ist hier die Entwicklung von Impfstoffen gegen *S. aureus*-Mastitiden (Leitner et al. 2003, Middleton et al. 2009) oder die Applikation von Zytokinen oder Lipopolysacchariden in die bovine Milchdrüse (Alluwaimi 2004, Daley et al. 1993, Kauf et al. 2007).

Der Einsatz lebender, probiotischer Mikroorganismen, vereint diese beiden Therapieansätze, da sie durch die Produktion antimikrobieller Substanzen und durch eine zwangsläufige Miteinbeziehung des Immunsystems zur Erregerelimination beitragen können. Zu den probiotischen Bakterien gehören auch die Milchsäurebakterien, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

2.2 Milchsäurebakterien

Als probiotische Bakterien werden Mikroorganismen definiert, die, wenn sie in einer adäquaten Menge aufgenommen werden, gesundheitliche Vorteile für den Wirt liefern (FAO und WHO 2006). Zu diesen Probiotika wird auch die Gruppe der

Milchsäurebakterien, die größtenteils als GRAS (generally recognized as safe) eingestuft werden, gezählt. Ihr natürliches Vorkommen in der Umgebung der Milchkuh und der Einsatz in vielen Bereichen der Lebensmittelproduktion (Aromabildung, hygienische Sicherung, Haltbarkeitsverlängerung) lassen sie für einen möglichen Einsatz im und am Euter geeignet erscheinen (Chaimanee et al. 2009, Erkkilä 2001, Espeche et al. 2009, Morgan et al. 1997, Stiles und Holzapfel 1997). In den folgenden Kapiteln soll näher auf die Herkunft, die Physiologie und die damit verbundenen antimikrobiellen Eigenschaften der Milchsäurebakterien eingegangen werden, um ein besseres Verständnis für ihre mögliche gesundheitsfördernde Wirkung zu schaffen

2.2.1 Taxonomische Einteilung und Physiologie der Milchsäurebakterien

Der Begriff Milchsäurebakterien umfasst eine heterogene Gruppe von Mikroorganismen, welche als gemeinsame metabolische Eigenschaft Milchsäure als Hauptendprodukt des Kohlenhydratstoffwechsels bilden (Carr et al. 2002). Taxonomisch eingeordnet gehören die Milchsäurebakterien zum Stamm der *Firmicutes* (lediglich *Bifidobacterium* gehört zum Stamm der *Actinomycetes*), darunter zur Klasse der *Bacilli* und hier zur Ordnung der *Lactobacilli*, welche sich in sechs Familien einteilt (*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactococcaceae*, *Leuconostocaceae*, und *Streptococcaceae*). Bekannte Milchsäurebakterien gehören zu den Gattungen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, und *Leuconostoc*. (Holzapfel und Wood 2014, S. 1–7). Milchsäurebakterien sind fermentative Mikroorganismen, welche auf natürliche Weise oder künstlich hinzugefügt in nährstoffreichen Umgebungen vorzufinden sind. Hierzu gehören neben Gräsern, Gemüse, Milch, Milchprodukten, Fleisch, Fleischprodukten und Einstreu auch Schleimhäute des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes von Mensch und Tier (Chaimanee et al. 2009, Marchesi und Shanahan 2007, Mozzi et al. 2010). Ihre effiziente Nutzung von Nährstoffen und die damit verbundene Produktion von organischen Säuren erlauben den Milchsäurebakterien einen selektiven Vorteil in den verschiedenen ökologischen Nischen. Neben Milchsäure werden durch den Metabolismus der Milchsäurebakterien eine Vielzahl von Substanzen gebildet, wie beispielsweise Diacetyl, Acetoin und

Dimethylethylenglykol aus dem Zitratzyklus und eine große Menge flüchtiger Komponenten und biologisch aktiver Peptide aus dem Aminosäurenkatabolismus (Mozzi et al. 2010, S. 3–33). Milchsäurebakterien sind Gram-positive, unbewegliche, nicht sporenbildende, Katalase-, Indol- und H₂S-negative, anaerobe, aber aerotolerante, säuretolerante Stäbchen oder Kokken, die nicht in der Lage sind, Nitrat zu verwenden (Mozzi et al. 2010, S. 3). Milchsäurebakterien können in drei Stoffwechselgruppen eingeteilt werden. Obligat homofermentative Arten, welche nur über den Embden-Meyerhoff-Parnas-Weg (Glykolyse) Laktat bilden und denen ein fermentativer Abbau von Pentosen nicht möglich ist. Fakultativ heterofermentative Stämme können neben der Glykolyse von Glukose auch Pentosen durch den Phosphoketolase-Weg verarbeiten. Die obligat heterofermentativen Stämme verbrauchen Glukose und Pentosen nur über den Phosphoketolase-Weg und produzieren eine große Anzahl von Fermentationsprodukten (Holzapfel und Wood 2014, S. 13–17). Zu diesen Fermentationsprodukten zählen neben den oben genannten Essigsäure, Ethanol, Kohlenstoffdioxid und Ameisensäure (Mozzi et al. 2010, S. 3–33).

2.2.2 Antimikrobielle Eigenschaften von Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien besitzen antimikrobielle Eigenschaften, die sie für den protektiven Einsatz in der Lebensmittelproduktion, aber auch für gesundheitsfördernde Zwecke bei Mensch und Tier qualifizieren. Dabei spielt die Produktion organischer Säuren, wie Milchsäure und Essigsäure, und die damit einhergehende pH-Wert-Absenkung eine wichtige Rolle (Holzapfel und Wood 2014, S. 44).

Ameisensäure, freie Fettsäuren, Ammoniak, Ethanol, Wasserstoffperoxid, Kohlenstoffdioxid, Diacetyl, Acetoin, 2,3-Butandiol, Acetaldehyd, Benzoe, bakteriolytische Enzyme und Bakteriozine, welche weitere Stoffwechselprodukte darstellen, können auf ein breites Spektrum von Mikroorganismen antagonistisch wirken (Holzapfel und Wood 2014, S. 50-51). Dieser Antagonismus ist auf biochemische Vorgänge, wie beispielsweise die Erhöhung der Membranpermeabilität, Zerstörung von Zellproteinen und Schaffung anaerober Bedingungen, zurückzuführen (Vuyst und Vandamme 1994). Des Weiteren üben Milchsäurebakterien als

Nährstoffkonkurrenten einen antagonistischen Effekt auf andere Mikroorganismen aus. Diese Konkurrenz zeichnet sich durch eine Reduzierung essentieller Substanzen, einer Minimierung der Adhäsionsfläche, einer Akkumulation von D-Aminosäuren, ein gesenktes Redoxpotential und eine Koaggregation aus (Vuyst und Vandamme 1994). Ein weiterer Mechanismus, welcher in jüngster Vergangenheit immer mehr in den Fokus der Forschung geraten ist, ist die Aktivierung und Modulation des Immunsystems des Wirtsorganismus durch die eingebrachten Bakterien und ihre Metaboliten und die damit einhergehende verstärkte Elimination der pathogenen Erreger (Cross 2002, Foligne et al. 2007). Mit besonderem Augenmerk auf einen Einsatz in der bovinen Milchdrüse konnte eine rapide Immunantwort in Form einer gesteigerten Genexpression von Zytokin-kodierenden Genen und damit einhergehend ein signifikanter Anstieg der Anzahl polymorphkerniger, neutrophiler Granulozyten gezeigt werden (Beecher et al. 2009, Crispie et al. 2008, Nagahata et al. 2015). Es wird vermutet, dass durch den kurzfristigen Anstieg der somatischen Zellen und hier besonders der neutrophilen Granulozyten eine Reduzierung und Eliminierung der pathogenen Keime erzielt werden kann (Crispie et al. 2008, Frola et al. 2012b).

2.2.3 Einsatz von Milchsäurebakterien in der Lebensmittelproduktion und Medizin

Das älteste Verfahren zur Haltbarmachung von rohen Lebensmitteln ist, neben der Trocknung, die Fermentation. Hierfür werden Milchsäurebakterien und ihre Metaboliten schon seit den ersten Ursprüngen der Landwirtschaft für die Konservierung von Lebensmitteln wie Fleisch, Gemüse und Milchprodukten eingesetzt (Makarova et al. 2006). Die Fermentation von Kohlenhydraten durch Milchsäurebakterien führt hauptsächlich durch die Bildung von Milchsäure, speziell D-Laktat, zu einer pH-Wert Absenkung bis 5,0 und niedriger. Dies verursacht eine Koagulation der Proteine, was zum einen die Konsistenz beeinflusst, aber auch den Geschmack und die Verdaulichkeit des Lebensmittels verbessert. Außerdem wird durch die Ansäuerung die Wasserretention gesenkt, was eine Trocknung des Endproduktes bedingt und zur mikrobiellen Stabilität beiträgt (Mozzi et al. 2010, S. 57). Diese Faktoren bewirken, dass durch den Einsatz von Milchsäurebakterien

Reifungszeiten reduziert, Herstellungsfehler minimiert und das Wachstum pathogener und lebensmittelverderbender Flora gehemmt werden können.

Milchsäurebakterien können zusätzlich die sensorischen Eigenschaften von Lebensmitteln verbessern. Sie tragen beispielsweise durch die Bildung von Diacetyl und Acetoin, welche Metaboliten des Pyruvatstoffwechsels sind, zum typischen Butteraroma bei (Molimard und Spinnler 1996).

Diese Mikroorganismen werden aber nicht nur aufgrund ihrer positiven Einflüsse auf den Herstellungsprozess von Lebensmitteln eingesetzt, sondern auch aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Eigenschaften als Probiotika verwendet. Der russische Zoologe und Immunologe Ilja Iljitsch Metchnikoff stellte Anfang des 20. Jahrhunderts die These auf, dass Personen, die vermehrt Milchprodukte zu sich nehmen, weniger an Darmentzündungen leiden und somit eine höhere Lebenserwartung haben. Er vermutete, dass unerwünschte Fäulnisvorgänge im Darm durch die Milchsäurebakterien unterdrückt werden, und beschrieb somit erstmals probiotische Ernährung (Metchnikoff 1908).

Aktuellere Arbeiten definieren Milchsäurebakterien als essentielle Mikroorganismen im Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt, die durch Immunmodulation, Sicherstellung der interstitiellen Integrität und Pathogenresistenz, gesundheitsfördernde Funktionen einnehmen (Vaughan et al. 2005). Laut Korhonen und Pihlanto (2006) sind Milchsäurebakterien als Produzenten für Peptide anzusehen, die immunmodulierende, antibakterielle, antihypertensive und Opioid-ähnliche Wirkung besitzen. Diese gesundheitlichen Effekte werden also direkt durch die Interaktion der lebenden Organismen mit dem Wirt und indirekt durch die entstehenden Metaboliten der Fermentation hervorgerufen (Holzapfel und Wood 2014, S. 50). So kommt es, dass Milchsäurebakterien positive Einflüsse auf Erkrankungen wie Laktoseintoleranz, Durchfall, Gastroenteritis, Reizdarmsyndrom, entzündliche Darmerkrankungen, Tumorerkrankungen und Infektionen des Urogenitaltraktes nachgesagt werden (Stanton et al. 2005) und sie vermehrt in den Fokus medizinischer Forschung rücken (Arroyo et al. 2010, Reid 2006).

Doch obwohl Milchsäurebakterien allgemein als GRAS angesehen werden und ein positives, gesundheitsförderndes Image genießen, sollten sie vor dem Einsatz im

Lebensmittel- und Medizinbereich intensiv auf Nichtpathogenität, Antibiotikaresistenzen und Anpassungsfähigkeit untersucht werden (FAO und WHO 2006). Beispielsweise konnten in der Vergangenheit durch verbesserte Diagnostikverfahren Erregerisolate aus bovinen Mastitismilchproben, welche aufgrund phänotypischer Untersuchungen zunächst der Gattung *Streptococcus* spp. zugewiesen wurden, nachträglich als Bakterien der Gattung *Lactococcus* identifiziert werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass zumindest einige Stämme einen ursächlichen Einfluss auf das Mastitisgeschehen haben können (Moroni et al. 2015, Plumed-Ferrer et al. 2013, Werner et al. 2014). Auch Salminen et al. (1998) betonen die Bedeutung einer gewissenhaften Untersuchung der Mikroorganismen vor dem Einsatz als Probiotika, um die Vorteile des Gebrauches dieser lebenden Mikroorganismen gegen die einhergehenden Risiken abschätzen zu können.

2.2.4 Bakteriozine: *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen

Von den durch Milchsäurebakterien gebildeten antimikrobiellen Stoffen sind die Bakteriozine von besonderer Bedeutung. Bakteriozine sind ribosomal gebildete, biologisch aktive Proteine oder Proteinkomplexe, die meist taxonomisch nah verwandte Bakterienspezies in ihrem Wachstum hemmen (enges Wirkspektrum). Einige Bakteriozine sind aber auch in der Lage nicht verwandte Mikroorganismen zu hemmen und verfügen über ein breites Wirkspektrum. Eine Vielzahl dieser Bakteriozine wurde schon beschrieben, aber es ist davon auszugehen, dass das Potential auf diesem Gebiet noch längst nicht ausgeschöpft ist (Lewus und Montville 1991). In einer ursprünglichen Einteilung von Klaenhammer (1993) werden Bakteriozine in vier Klassen eingeteilt. Klasse I umfasst kleine, membranaktive Peptide, welche die ungewöhnlichen Aminosäuren Lanthionin und oder Methyllanthionin enthalten, weswegen sie auch als Lantibiotika bezeichnet werden. Bakteriozine der Klasse II sind kleine, hitzestabile, nicht lanthioninhaltige, membranaktive Peptide, welche amphiphile Helices bilden und in drei Untergruppen eingeteilt werden. Peptide, die gegen Listerien aktiv sind, bilden Klasse II a, Zweikomponentenpeptide die Klasse II b und schwefelhaltige Peptide die Klasse II c. Große hitzelabile Proteine bilden die Klasse III und zur Klasse IV werden Bakteriozine

gezählt, welche zusätzlich Lipid- oder Kohlenhydratkomponenten aufweisen (Christ 2007). Eine Neueinteilung aus dem Jahr 2005 klassifiziert die Bakteriozine in zwei Gruppen. Die lanthioninhaltigen und die nicht lanthioninhaltigen Bakteriozine (Klasse I und II). Die ehemalige Klasse III bildet aufgrund ihrer lytischen Wirkung eine eigene Klasse, die Bakteriolytine. Da bisher Nachweise für die Existenz von Klasse IV Bakteriozinen fehlen, entfällt diese Gruppe ganz (Cotter et al. 2005).

Bakteriozine differenzieren sich von Antibiotika im Hinblick auf ihre Synthese, Wirkungsweise, Toxizität, Resistenzmechanismen und ihr antimikrobielles Spektrum. Im Gegensatz zu Antibiotika, welche oft sekundäre Metaboliten darstellen, sind die ribosomal synthetisierten Bakteriozine sensitiv gegenüber Proteasen, und ihre antimikrobielle Wirkung beruht auf Störung der Zellmembranintegrität durch Porenbildung und Beeinflussung der Zellmembranbiosynthese.

Die Autoren Rogers und Whittier (1928) berichteten von einem Weiterbestehen der Hemmwirkung nach Elimination des pH-Wert-Einflusses und beschrieben damit erstmals Nisin, das bekannteste von *Lactococcus (Lc.) lactis* gebildete, Bakteriozin. Nisin gehört zu den Klasse I Bakteriozinen und hat eine breite antimikrobielle Aktivität gegenüber Gram-positiven Mikroorganismen (Barefoot und Nettles 1993, Benkerroum und Sandine 1988, Broadbent et al. 1989). Nisin wurde von der Europäischen Union (1983) und der amerikanischen Food and Drug Administration (1988) zum Einsatz im Lebensmittel-, Arznei- und Kosmetikbereich zugelassen und wird bei der Herstellung von Käse, Milchprodukten und Gemüsekonserven eingesetzt (Cotter et al. 2005).

Durch die antibakterielle Aktivität gegenüber wichtigen Verderbnis- und Krankheitserregern ergibt sich nicht nur der Einsatz von Nisin im Lebensmittelsektor zur Haltbarkeitsverlängerung, sondern auch im Medizinbereich als klinisches Therapeutikum. Der erste Bericht einer Mastitisbehandlung mit einem Bakteriozin stammt von Taylor et al. (1949). Nach einer Behandlung mit Nisin waren die Viertelgemelksproben bei 9 von 10 durch *S. aureus* sowie 30 von 37 durch *Sc. agalactiae* hervorgerufenen Mastitiden bakteriologisch negativ. Allerdings konnte bei Mastitiden, die durch *Sc. dysgalactiae* verursacht wurden, keine Wirkung erzielt werden.

Als Desinfektionsmittel erzielte Nisin vergleichbare keimreduzierende Ergebnisse wie eine 1%ige Jodlösung, zeigte aber geringere Irritationen der Haut als diese (Sears et al. 1992a). In einer Kombination mit Lysostaphin konnten durch Nisin klinische Heilungsraten intramammärer Infektionen von 66% für *S. aureus*, 95% für *Sc. agalactiae* und 100% für *Sc. uberis* erreicht werden (Sears et al. 1992b).

Cao et al. (2007) und Wu et al. (2007) konnten ebenfalls eine Wirkung von Nisin Z, einem Bakteriozin, welches sich lediglich durch eine Aminosäuresubstitution von Nisin unterscheidet (Mulders et al. 1991), in der Heilung von subklinischen und klinischen Mastitiden zeigen. Auch in der Humanmedizin konnte eine antibakterielle Wirkung von Nisin bei Frauen mit *S. aureus*-Mastitis nachgewiesen werden (Fernández et al. 2008).

Ein weiteres gut erforschtes Bakteriozin ist Lacticin 3147, welches in der Lage ist, Keime mit nachgewiesener Antibiotikaresistenz zu hemmen (Galvin et al. 1999, Ross et al. 1999). Dieses Bakteriozin zeigte in der Formulierung eines Zitzenversieglers Effektivität gegenüber *Sc. dysgalactiae* und *S. aureus* in der Trockenperiode und Laktation (Meaney et al. 2001, Ryan et al. 1999, 1998, Twomey et al. 2000). Auch als Zitzendippmittel konnte eine deutliche Keimzahlreduzierung für *S. aureus*, *Sc. dysgalactiae* und *Sc. uberis* beobachtet werden (Klostermann et al. 2010).

2.2.5 Hemmende Eigenschaften lebender Milchsäurebakterien: *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen

Zunächst wurden Milchsäurebakterien mit antagonistischer Aktivität aus Rohmilchprodukten oder anderen Materialien aus der Umgebung der Milchkuh isoliert und auf ihre hemmenden Eigenschaften untersucht (Chaimanee et al. 2009, Espeche et al. 2012, 2009, Millette et al. 2007, Soleimani et al. 2010, Suneel und Basappa 2013). Anas et al. (2008) zeigten in einer Magermilchmischkultur die Wachstumseinschränkungen von *S. aureus* durch einen *Lactobacillus (Lb.). plantarum* Stamm, der aus Ziegenmilch isoliert wurde. In einer anderen Arbeit wurde die antimikrobielle Aktivität von einem Gemisch aus sterilem Honig und 13 aus Honig isolierten Milchsäurebakterien gegenüber 27 Euterpathogenen getestet (Piccart et al. 2016). Die Milchsäurebakterien-Honig-Kombination war in der Lage, alle 27

Pathogene in ihrem Wachstum zu hemmen, steriler Honig ohne Milchsäurebakterien konnte dies nicht.

Neben dem antagonistischen Potential wurden *in-vitro* zusätzlich auch die probiotischen Eigenschaften wie Adhäsionsfähigkeit oder Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten, und Sicherheitsaspekte wie Antibiotikaresistenz, Hämolyse- und Enzymaktivität untersucht (Espeche et al. 2012, Frola et al. 2012a, Leite et al. 2015). In einer ersten klinischen Studie verglichen Greene et al. (1991) die Behandlung subklinischer Mastitiden durch eine Infusion von lebenden Milchsäurebakterien, die aus einem kommerziellen, probiotischen Produkt zur oralen Gabe bei Kälbern isoliert wurden, mit einer konventionellen, antibiotischen Behandlung. Die bakteriologischen Heilungsraten waren in der Studie bei Applikation der Milchsäurebakterien geringer als bei der antibiotischen Therapie. Außerdem wurde ein enormer Anstieg des Gehaltes somatischer Zellen durch die Milchsäurebakterieninfusion beobachtet und kritisch diskutiert. Aufgrund der vielversprechenden Versuchsergebnisse zu dem Bakteriozin Lacticin 3147, untersuchten Klostermann et al. (2008) die therapeutische Wirkung des direkten Einsatzes des produzierenden Stammes *Lc. lactis* DPC3147. In den zwei Teilversuchen, in welche subklinisch und klinisch erkrankte Milchdrüsenviertel einbezogen wurden, war die klinische und bakteriologische Heilungsrate mit der einer antibiotischen Therapie vergleichbar (als pathogen-frei galten Proben mit <math><500\text{ KbE}</math> (Kolonie-bildende Einheiten) / ml). Um die maximal zu applizierende Bakteriendichte zu definieren, bei der noch keine entzündliche Reaktion im Drüsengewebe erzeugt wird, verabreichten Frola et al. (2012a) drei verschiedene Bakterienkonzentrationen. Erste klinische Zeichen und Veränderungen im Milchsekret wurden ab einer applizierten Menge von 5 ml *Lb. perolens* CRL 1724 in einer Konzentration von 10^9 KbE / ml beobachtet. In einer weiteren Studie wurde die bakteriologische Heilungsrate und die Immunantwort durch eine Behandlung mit *Bifidobacterium breve* (3 ml, 3×10^9 cfu / ml) bestimmt (Nagahata et al. 2015). Die Heilungsraten lagen in diesen Untersuchungen je nach Erreger zwischen 20% und 62%.

3 Material und Methoden

Die aus dem Literaturstudium gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Physiologie und Herkunft der Milchsäurebakterien und die technischen Erfahrungen aus einem Projekt zur Entwicklung eines auf Milchsäurebakterien basierenden Zitzentauchmittels (EFRE- Europäischer Fond für regionale Entwicklung) wurden genutzt, um im ersten Teil dieser Arbeit einen Versuchsaufbau zur Isolierung von Milchsäurebakterien aus dem bovinen Umfeld und einer anschließenden Prüfung ihrer Eigenschaften zu erarbeiten.

Die in der Literatur beschriebenen Erfahrungen aus vorangegangenen *in-vitro* Studien und die Ergebnisse unserer Untersuchungen wurden im zweiten Teil angewendet, um Versuche zur Verträglichkeitsprüfung bei intramammärer Applikation dieser lebenden Mikroorganismen zu planen.

3.1 Teil I: Isolierung und Charakterisierung von Milchsäurebakterien aus dem Umfeld des Rindes

3.1.1 Betriebe und Probennahme

Zur Isolierung der Milchsäurebakterien wurden aus 29 konventionellen norddeutschen Milchviehbetrieben Viertelgemelks-, Tankmilch-, Gras-, Einstreu- und Gülleproben untersucht. Viertelgemelksproben wurden gemäß den DVG-Richtlinien aseptisch aus klinisch gesunden Eutervierteln gewonnen (Somatischer Zellgehalt (SCC) < 100.000 Zellen / ml, kein Erregernachweis in 0,01 ml Milch). Hierfür wurde die Zitze zunächst mit einem Papiertuch gereinigt; nach Verwerfen der ersten Milchstrahlen und Desinfektion der Zitzenkuppen mit 70%igen Alkohol wurde die Milch dann in einem sterilen Milchröhrchen aufgefangen (DVG 2009).

Alle Proben wurden bei 5°C gelagert und innerhalb von 12 h in das mikrobiologische Labor der Fakultät II der Hochschule Hannover transportiert und hier weiter untersucht.

3.1.2 Isolierung der Milchsäurebakterien

Für die Isolierung von Milchsäurebakterien wurden fortlaufende Dezimalverdünnungen der Milchproben mit Ringer-Lösung (Merck, Darmstadt, Germany) auf de Man, Rogosa und Sharpe Agar (MRS; Merck, Darmstadt, Deutschland) ausgespatelt und anaerob bei 37°C für 48 h bebrütet. Einstreu-, Gras- und Gülleproben (10 g) wurden zunächst in 100 ml MRS-Bouillon (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei 37°C für 24 h bebrütet. Anschließend wurden Dezimalverdünnungen dieser Bouillon auf MRS-Agar ausgestrichen. Kolonien wurden willkürlich entnommen (ungefähr 1% der sichtbaren Kolonien) und nach erneuter Inkubation in MRS-Bouillon (anaerobe Bebrütung, 37°C, für 24 h) auf MRS-Agar zur Erstellung einer Reinkultur ausgestrichen (anaerobe Bebrütung, 37°C, für 48 h). Gram-positive, Katalase-negative, Oxidase-negative (Bactident® Oxidase; Merck, Darmstadt, Deutschland), fermentative (OF-Medium mit Zusatz von D(+)-Glucose Monohydrat; Merck, Darmstadt, Deutschland), H₂S- und Indol-negative, unbewegliche (SIM-Agar, Merck, Darmstadt, Deutschland) Stäbchen oder Kokken wurden als präsumtive Milchsäurebakterien definiert. Zusätzlich wurden die Äskulinhydrolyse (Äskulin-Blut-Agar, Oxoid, Wesel, Deutschland), das Wachstum in 6,5% NaCl enthaltender Standard-I-Bouillon (Merck, Darmstadt, Deutschland) und das Wachstum bei 45°C in MRS-Bouillon untersucht (Björkroth et al. 2014, Franz et al. 2014, Pot et al. 2014, Teuber and Geis 2006).

Die Milchsäurebakterienisolate wurden in MRS-Bouillon mit einem Zusatz von 20% Glycerin bei -80°C gelagert und für alle weiteren Untersuchungen anaerob in MRS-Bouillon bei 37°C für 24 h bebrütet bzw. für weitere Untersuchungen subkultiviert.

3.1.3 Antimikrobielle Aktivität / Well-Diffusions-Test

Das Screening auf antimikrobielle Aktivität gegenüber sechs ausgewählten Indikatorpathogenen wurde mittels Well-Diffusions-Test nach Ryan et al. (1996) mit einigen Modifikationen durchgeführt. Diese Methode wurde aus einem EFRE-Projekt (Entwicklung eines Mastitiserreger abtötenden Zitzentauchmittels auf mikrobiologischer Basis für die Trockenperiode des Rindes) übernommen und basiert auf dem Prinzip der Diffusion antimikrobieller Substanzen durch ein festes oder halbfestes Kulturmedium, wodurch das Wachstum sensibler Indikatororganismen

gehemmt wird. Um den Hemmmechanismus genauer zu definieren, wurde zusätzlich von jedem Milchsäurebakterienisolat der zellfreie, pH-neutralisierte Überstand und der Effekt der Zugabe von Katalase, Pepsin oder Trypsin, mittels Well-Diffusions-Test untersucht.

Die Indikatorstämme *Escherichia (E.) coli* DSM 4230, *S. aureus* ATCC 12600, *Sc. agalactiae* ATCC 27956, *Sc. uberis* ATCC 700407, *S. epidermidis* 575/07 und *S. xylosus* 35/07 (beide aus Mastitis-Milchproben isoliert) wurden von der Fakultät II der Hochschule Hannover (Deutschland) bereitgestellt. Diese Indikatorstämme wurden in Hirn-Herz-Bouillon (BHI) (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei 37°C für 24 h kultiviert. Nach Anzucht der Milchsäurebakterienisolate bei 37°C für 24 h wurde ein Teil der Bouillonkultur mit 1 Mol/l NaOH auf einen pH-Wert von 6,5 - 7,0 neutralisiert, um einen hemmenden Effekt durch einen niedrigen pH-Wert ausschließen zu können. Der zellfreie Überstand wurde mittels Zentrifugation bei 940*g für 5 min bei 4°C (Hettich Zentrifuge, Rotixa RP, Amsterdam, Niederlande) und anschließender Filtration des Überstandes mit einem Aufsatzfilter mit 0,2 µm Porengröße (Minisart, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) hergestellt.

Um die mögliche hemmende Aktivität von Wasserstoffperoxid eliminieren zu können, wurde diesem Überstand 0,1 ml einer Katalase-Lösung (von *Micrococcus lysodeikticus*, 226.1701 U/ml; Fluka, Hamburg, Deutschland; Inkubation für 30 min bei 25°C) hinzugefügt. Des Weiteren wurden jeweils 0,1 ml Pepsin-Lösung oder 0,1 ml Trypsin-Lösung (Inkubation für 30 min bei 25°C) dem zellfreien, pH neutralisierten Überstand hinzugefügt, um auf mögliche, hemmende Proteine oder Peptide rückschließen zu können. Die genannten Proteinase-Lösungen wurden aus 1 mg Pepsin (aus Schweinemagen, 6,545 U/mg; Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) oder 1 mg Trypsin (aus Schweinepankreas, 13,644 U/mg; Fluka, Hamburg, Deutschland) mit Zugabe von 1 ml eines 50 mmol Tris-HCL Puffers (pH 7,0) hergestellt.

Die Milchsäurebakterienkultur und deren zu testenden Lösungen wurden bei 7°C für maximal 2 h bis zur Durchführung des Well-Diffusionstests gelagert. Das Testnährmedium bestand aus 20 ml Müller-Hinton-Agar (Oxoid, Wesel, Deutschland), beimpft mit jeweils 10⁵ KBE der Indikatororganismen, welche zuvor in Hirn-Herz-

Bouillon inkubiert wurden (37°C, 24 h). Wells mit einem Durchmesser von 5 mm wurden in den gelierten Agar geschnitten und anschließend mit 50 µl der jeweiligen Lösungen befüllt. Um eine ausreichende Diffusion in das Medium zu gewährleisten, wurden die Petrischalen zunächst für 12 h bei 7°C aufbewahrt, bevor sie bei 37°C für 24 h inkubiert wurden (Mathot et al. 2003).

Eine Wachstumshemmung des Indikatorkeims und damit antibakterielle Aktivität lag vor, wenn eine klare Zone mit einer Breite von mindestens 2 mm um das Well sichtbar wurde (Hemmzone). Zur Überprüfung der Testmethode wurde eine hochkonzentrierte Nisin-Lösung, gelöst in MRS-Bouillon (Endkonzentration 60 mg/l, pH 6,5; Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland), als Positivkontrolle genutzt. Die Wirkung dieses Bakteriozins wird durch keine der beschriebenen Behandlungen reduziert. Nisin ist in der Lage die Gram-positiven Indikatorpathogene in ihrem Wachstum zu hemmen. Als Negativkontrolle wurde MRS-Bouillon ohne Nisin verwendet.

3.1.4 Biochemische und genetische Speziesidentifikation

Milchsäurebakterienisolate mit antibakteriellen Eigenschaften wurden zur weiteren Speziesidentifikation mit einem kommerziellen, semi-quantitativen Analytical Profile Index Test (API 50 CHL Medium; Biomerieux, Nürtingen, Deutschland) nach Herstellervorgaben untersucht. Eine Mischung aus dem API 50 CHL Medium und dem zu identifizierenden Mikroorganismus wurde in jede Kammer des Untersuchungstreifens gegeben. Nach Inkubation für 24 h und 48 h bei 37°C, konnte durch einen Farbumschlag die jeweilige, speziestypische Kohlenhydratfermentation detektiert werden.

Um die Ergebnisse der API-Untersuchung zu bestätigen, wurde ein PCR-basierter Nachweis der ausgewählten Stämme durchgeführt. Zur Bestimmung des Genus *Lactobacillus* wurde das Verfahren nach Singh und Ramesh (2008) verwendet. Die Spezies *Lb. plantarum* und *Lc. paracasei* wurden nach Kwon et al. (2004) und Ward und Timmins (1999) determiniert.

Abweichend von den beschriebenen Methoden wurden die DNA-Extraktionen mittels kommerziellen Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit nach Herstellervorgaben durchgeführt. Das Reaktionsvolumen enthielt 12,5 µl ReadyMix Taq PCR Reaction Mix

mit $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland), 5 μl DNA und 2 μl Primer (Konzentration gemäß der entsprechenden Methode), aufgefüllt mit Wasser auf 25 μl (Water Molecular biology degrade BC; AppliChem, Darmstadt, Deutschland). Die Polymerase Chain Reaction (PCR) wurde in einem Stratagene Mx 3005P Thermocycler durchgeführt. Nach Färbung mit Midori Green (biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) wurden die PCR-Produkte mittels 1,6%iger Agarosegel-Elektrophorese getrennt und anschließend durch UV-Illumination mit Gene Snap (Synergene, Cambridge, UK) visualisiert.

3.1.5 Adhäsion an bovine Zitzenkanal-Epithelzellen

In weiteren Untersuchungen wurde die Adhäsionsfähigkeit der ausgewählten Milchsäurebakterienstämme an bovine Zitzenkanal-Epithelzellen nach zuvor von Frola et al. (2012a) und Otero und Nader-Macías (2007) beschriebener Methode bestimmt. Hierfür wurden die ausgewählten Milchsäurebakterienisolate in 20 ml MRS-Bouillon (pH 5,5) bei 37°C für 48 h bebrütet. Nach Zentrifugation für 10 min bei 900*g (Hettich Zentrifuge, Rotixa RP), wurde das Bakterienpellet zweimal mit 5ml Ringer-Lösung und einmal mit 5 ml Eagle´s Minimum Essential Media (MEM; Gibco, Thermo Scientific, USA, pH 7,0) gewaschen und dann in 2 ml MEM suspendiert, um eine Konzentration von 10^7 KbE / ml zu erhalten.

Die Zitzenkanal-Epithelzellen wurden aus frischen Eutern von Schlachttieren isoliert. Nach Reinigung der Euter mit Wasser wurden die Epithelzellen durch wiederholtes Auskratzen des Zitzenkanals mit einem Löffelspatel gewonnen und sofort in 10 ml MEM suspendiert. Diese Suspension wurde für 10 min bei 900*g und 8°C zentrifugiert (Hettich Zentrifuge, Rotixa RP), das Zellpellet dreimal mit jeweils 5 ml MEM gewaschen und schließlich mit einer Endkonzentration von 10^5 Zellen / ml in 2 ml MEM überführt. Die jeweiligen Bakterien- und Zellzahlen wurden mikroskopisch mittels Gramfärbung bzw. Färbung nach Prescott und Breed (1910) ermittelt.

Die Epithelzell- und Bakteriensuspensionen (500 μl) wurden gemischt und unter leichter Bewegung bei 37°C für 1 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine Epithelzellsuspension ohne Bakterien mitgeführt. Um nicht-bindende Bakterien zu entfernen, wurde die inokulierte Suspension erneut für 10 min bei 500*g zentrifugiert

(Hettich; Spectrafuge 16M) und das Zellpellet viermal mit MEM gewaschen. Die Adhäsion der Bakterien an die Epithelzellen wurde im Anschluss an die Gramfärbung mikroskopisch untersucht und wie folgt berechnet:

$$\text{Adhäsion (\%)} = \frac{\text{Anzahl der Epithelzellen mit anhaftenden Bakterien}}{\text{Anzahl der gesamten Epithelzellen}} \times 100$$

$$\text{Adhäsionsindex} = \frac{\text{Anzahl der anhaftenden Bakterien an Epithelzellen}}{\text{Anzahl der Epithelzellen mit anhaftenden Bakterien}}$$

3.1.6 Hämolyseproduktion und antibiotische Resistenz der Milchsäurebakterienstämme

Um die Präsenz möglicher Virulenzfaktoren zu bestimmen, wurde die Hämolyseproduktion der selektierten Stämme auf Äskulin-Blut-Agar (Oxoid, Wesel, Deutschland) mit einem Zusatz von 5% Schafsblut unter anaeroben Bedingungen bei 37°C für 48 h untersucht. Eine klare Zone um die Kolonien wurde als positiv gewertet (Espeche et al. 2012).

Die Präsenz von Genen, die für eine antibiotische Resistenz kodieren, wurde mit zuvor beschriebenen PCR-Methoden ermittelt (Clark et al. 1999, Rojo-Bezares et al. 2006, Zonenschain et al. 2009). Eingeschlossen in diese Untersuchung waren Gene, die einen Resistenznachweis gegenüber β -Laktamen (blaZ), Chloramphenicol (catA), Tetrazyklin (tetM, tetS, tetW), Makroliden (ermB, ermC), Chinolonen (gryA) und Aminoglykosiden (aph(3')-III, aadA, aadE, ant(6)) ermöglichen (siehe Tabelle 1). Extraktion, PCR und Gelelektrophorese wurden wie bereits unter 3.1.4 beschrieben, ausgeführt. Zusätzlich wurde die Plasmid-DNA mittels kommerziellen Plasmid Mini Kit (Qiagen) unter Herstellervorgaben isoliert und in die Untersuchung eingeschlossen.

Tabelle 1. Angewandte Primer Sequenzen und PCR Konditionen für den Nachweis von für Resistenz kodierenden Genen

Antibiotika-Gruppe	Gene	Primer Sequenzen (5'-3')	Primer Annealing Temp.(°C)	Produkt Größe (bp)	Quellenangabe
β-Lactame	<i>blaZ-F</i>	<i>ACTTCAACACCTGCTGCTTTC</i>	57	173	Martineau et al. 2000
	<i>blaZ-R</i>	<i>TGACCACTTTTATCAGCAACC</i>			
Chloramphenicol	<i>catA</i>	<i>GGATATGAAATTTATCCCTC</i>	50	486	Rojo-Bezares et al. 2006
	<i>catA</i>	<i>CAATCATCTACCCCTATGAAT</i>			
Tetracycline	<i>tetM</i>	<i>ACAGAAAGCTTATTATATAAC</i>	55	171	Aminov et al. 2001
	<i>tetM</i>	<i>TGGCGTGTCTATGATGTTTAC</i>			
	<i>tetS</i>	<i>GAAAGCTTACTATACAGTAGC</i>	50	169	Aminov et al. 2001
<i>tetS</i>	<i>AGGAGTATCTACAATATTTTAC</i>				
	<i>tetW</i>	<i>GAGAGCCTGCTATATGCCAGC</i>	64	168	Aminov et al. 2001 in Zonenschain et al. 2009
	<i>tetW</i>	<i>GGGCGTATCCACAATGTTAAC</i>			
Macrolide	<i>ermB</i>	<i>GGTAAAGGGCATTAAACGAC</i>	40	454	Zonenschain et al. 2009
	<i>ermB</i>	<i>CGARATTCTCGATTGACCCA</i>			
	<i>ermC</i>	<i>ATCTTTGAAATCGGCTCAGG</i>	40	294	Zonenschain et al. 2009
	<i>ermC</i>	<i>CAAACCCGTATTCCACGATT</i>			
Quinolone	<i>gryA</i>	<i>CACCAATCACACGCAATG</i>	60	246	Fazzeli et al. 2013
	<i>gryA</i>	<i>GTATTCCAACCGATATTCACC</i>			
Aminoglycoside	<i>alph(3')-III</i>	<i>GCCGATGTGGATTGCGAAAA</i>	60	292	Rojo-Bezares et al. 2006 in Zhou et al. 2012
	<i>alph(3')-III</i>	<i>GCTTGATCCCCAGTAAGTCA</i>			
	<i>aadA</i>	<i>TGATTTGCTGGTTACGGTGAC</i>	60	284	Clark et al. 1999
	<i>aadA</i>	<i>CGCTATGTTCTCTTGGCTTTTG</i>			
	<i>aadE</i>	<i>GCAGAACAGGATGAACGTATTCG</i>	55	369	Klare et al. 2007
<i>aadE</i>	<i>ATCAGTCGGAACCTATGTCCC</i>				
	<i>ant(6)</i>	<i>ACTGGCTTAATCAATTTGGG</i>	58	597	Rojo-Bezares et al. 2006 in Zhou et al. 2012
	<i>ant(6)</i>	<i>GCCTTTCGCCACCTCACCG</i>			

3.1.7 Wachstum in Milch

Die ausgewählten Milchsäurebakterienisolate wurden nach Le Marc et al. (2009) auf ihre Fähigkeit untersucht, Milch als Nährmedium zu nutzen. Hierfür wurden, in einem doppelten Ansatz, 10 ml einer kommerziellen, ultrahoherhitzten (UHT) Milch mit 0,1 ml MRS-Bouillon des jeweiligen Milchsäurebakterienisolates (37°C, 24 h) beimpft. Während der aeroben Inkubation bei 37°C wurden die Anzahl kolonie-bildender Einheiten und der pH-Wert nach 0, 4, 8, und 24 h bestimmt. Die Keimzahlbestimmung wurde mittels Plattengussverfahren mit MRS-Agar durchgeführt.

3.2 Teil II: Orientierende Untersuchungen der Gewebeerträglichkeit, Etablierung und Immunantwort nach intramammärer Infusion von *Lb. plantarum* 118/37 in die bovine Milchdrüse

3.2.1 Auswahl des Milchsäurebakterienstamms und Herstellung einer konservierbaren Applikationsform der Lebendkultur

Der in dieser Untersuchung verwendete Milchsäurebakterienstamm *Lb. plantarum* 118/37 (Mikrobiologie, Abteilung Bioverfahrenstechnik, Fakultät II, Hochschule Hannover) wurde in der vorangegangenen Untersuchung aus boviner Milch isoliert und im Hinblick auf antimikrobielle und probiotische Eigenschaften charakterisiert. Als Auswahlkriterien für die weitere Verwendung wurden die Hemmfähigkeit gegenüber potentiellen Euterpathogenen, die Adhäsion an bovine Zitzenkanalepithelzellen, das Wachstum in Milch als Nährmedium und das Nichtvorhandensein von für Resistenz kodierenden Genen festgelegt (Diepers et al. 2016).

Lb. plantarum 118/37 wurde in MRS-Bouillon (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einem Zusatz von 20% Glycerin bei -80°C gelagert und vor Benutzung zweimalig in MRS-Bouillon bei 37°C für 24 h subkultiviert. Mit dem Ziel, ein Therapeutikum auf Basis einer lagerfähigen, stabilen und schnell zu applizierenden Lebendkultur herzustellen, wurde die Milchsäurebakterienkultur wie nachfolgend beschrieben präpariert und gefriergetrocknet. *Lb. plantarum* 118/37 wurde in MRS-Bouillon (1%, v/v) bei 37°C für

17 h kultiviert. Für eine applizierbare Bakterienkonzentration von 10^4 und 10^6 KbE / ml nach dem Gefriertrocknen wurde die Milchsäurebakterienkultur mit Ringer-Lösung auf eine Konzentration von 10^6 bzw. 10^8 KbE / ml verdünnt. Anschließend wurden die Bakterienzellen mittels Zentrifugation bei $940 \times g$ und 5°C für 10 min (Hettich Zentrifuge, Rotixa RP, Amsterdam, Niederlande) gewonnen. Das Zellpellet wurde mit 10 ml Ringer-Lösung gewaschen, erneut zentrifugiert und, nach Verwerfen des Überstandes, in 50 ml eines Mediums aus pyrogen-freier Ringer-Lösung (B. Braun, Melsungen, Deutschland) (25%, v/v), verdünnt mit pyrogen-freiem Wasser (B. Braun, Melsungen, Deutschland) und Zugabe einer steril-filtrierte ($0.2 \mu\text{m}$ pore size filter, Minisart, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) Laktose-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) (5%, w/v), gegeben. Je 1 ml dieser Suspension wurde in Glasampullen (Injection vials, 20ml, Wheaton Industries Inc., Millville, USA) abgefüllt und bei -80°C für 3 h tiefgefroren. Die tiefgefrorene Zellsuspension wurde anschließend in einem Alpha 1-2 LD plus Gefriertrockner (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) bei 0,7 mbar und -24°C für 23 h gefriergetrocknet. Die Ampullen wurden luftdicht verschlossen und bei -20°C gelagert.

Vor Gebrauch der Applikationsdosen wurde das gefriergetrocknete Zellpellet in 10 ml pyrogen-freier Ringer-Lösung (25%, w/v), verdünnt mit pyrogen-freiem Wasser, resuspendiert. Die gewonnenen Suspensionen enthielten somit zwei Dosierungen lebensfähiger *Lb. plantarum* 118/37 mit den jeweiligen Konzentrationen von $5,1 \pm 0,3 \times 10^4$ KbE / ml und $6,1 \pm 1,7 \times 10^6$ KbE / ml (Durchschnitt 10 verschiedener Applikationsdosen).

Für den Dosisfindungsversuch wurden die hergestellten Applikationsdosen kombiniert, verdoppelt oder verdreifacht ($1,01 \times 10^6$ KbE / ml, $2,0 \times 10^6$ KbE / ml, $3,0 \times 10^6$ KbE / ml), wobei das applizierte Volumen der Bakteriensuspension konstant bei 10 ml blieb.

3.2.2 Betriebe und Tiere

Für den Gewebeverträglichkeits- und Dosisfindungsversuch wurden Tiere aus einem norddeutschen, konventionellen Milchviehbetrieb mit 170 laktierenden Milchkühen, vorwiegend der Rasse Deutsche Holstein, mit einer mittleren 305-Tage-Leistung von

10.500 kg ECM (energiekorrigierte Milch), und einer mittleren Tankmilchzellzahl von 200.000 Zellen / ml ausgewählt. Auf dem Betrieb wird nach manuellem Vormelken und Reinigen der Zitzen mit einem Papiertuch zweimal täglich gemolken. Die Zitzendesinfektion erfolgt mit einem jodhaltigen, schäumenden Dippmittel in der Konzentration 3000 ppm vor und nach der Melkung. Alle Kühe werden abrupt trockengestellt und mit einem antibiotischen Langzeitpräparat und einem internen Zitzenversiegler versorgt. Nach Auswahl der geeigneten Tiere und Euterviertel wurde der Versuch in einem Zeitraum von Dezember 2016 bis April 2017 durchgeführt.

Für die orientierenden Untersuchungen zur Gewebereaktion und Auswirkungen auf das Allgemeinbefinden nach intramammärer Applikation der Milchsäurebakterien wurden drei ältere, klinisch gesunde Kühe (> 7. Laktation) gewählt.

Ausschlusskriterien waren eine klinische Mastitis, andere sichtbare Erkrankungen mit Veränderung des Allgemeinzustandes, Zitzenverletzungen, systemische oder intramammäre Behandlungen mit einem antimikrobiellen Präparat in den letzten 30 Tagen oder eine Milchleistung von weniger als 5 kg am Tag.

Für den Dosisfindungsversuch wurden drei klinisch eutergesunde Tiere (keine Entzündungszeichen des Eutergewebes oder sichtbare Veränderungen im Milchsekret) bei gleichen Ausschlusskriterien ausgewählt.

Die Durchführung dieses Versuchs wurde vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit unter dem Aktenzeichen 33.12-42502-04-15/1909 genehmigt.

3.2.3 Behandlungsprotokoll

Zur erstmaligen Prüfung der Gewebeverträglichkeit und Einstufung der zellulären und klinischen Reaktion des Euters nach Applikation von Milchsäurebakterien, wurden bei drei Kühen zwei unterschiedliche, niedrige Bakterienkonzentrationen angewendet. In drei Euterviertel jeder Kuh wurden einmalig entweder 10 ml einer Bakteriensuspension mit 10^4 KbE / ml, 10^6 KbE / ml *Lb. plantarum* 118/37 oder nur das verwendete Lösungsmittel nach der Melkung appliziert. Das verbleibende Viertel wurde als Kontrollviertel nicht behandelt (siehe Tabelle 2).

Für den Dosisfindungsversuch wurden drei Euterviertel jeder Kuh mit einer Bakteriensuspension mit entweder 2×10^6 KbE / ml, 3×10^6 KbE / ml oder $10^4 + 10^6$ KbE / ml *Lb. plantarum* 118/37 behandelt. Das verbleibende Viertel wurde als Kontrollviertel nicht behandelt (siehe Tabelle 3).

Nach klinischer Untersuchung des Euters und Beurteilung des Sekretes wurden unter aseptischen Bedingungen Viertelgemelksproben gezogen und die jeweiligen Behandlungen randomisiert zugeteilt. Die gefriergetrockneten Milchsäurebakterien wurden zur Applikation zunächst mit dem oben beschriebenen Lösungsmittel (vgl. Kapitel 3.2.1) resuspendiert. Nach Desinfektion der Zitzenkuppe mit 70%igem Alkohol, wurden die Applikationsdosen mittels einer Spritze mit aufgesetzter Zitzenkanüle (17 mm) durch den Zitzenkanal direkt in die Zitzenzisterne verbracht.

Im Anschluss wurden bei jeder Melkung eine klinische Untersuchung des Allgemeinbefindens, des Euters und eine Beurteilung des Milchsekretes durchgeführt. Das Euter wurde im Hinblick auf Verhärtungen, Schwellungen, Schmerzhaftigkeit und Wärme palpiert und das Sekret visuell auf Flocken oder Farb- und Konsistenzveränderungen untersucht. Zusätzlich wurden Viertelanfangsgemelksproben an den unten genannten Zeitpunkten gezogen.

Tabelle 2 Behandlungsprotokoll für die Prüfung der Gewebeverträglichkeit nach einmaliger intramammärer Applikation von Milchsäurebakterien in der Konzentration 10^4 bzw. 10^6 KBE / ml.

Behandlung	Viertelposition		
	Tier 1	Tier 2	Tier 3
10 ml 10^4 KbE / ml <i>Lb. plantarum</i> 118/37	HR	HL	VR
10 ml 10^6 KbE / ml <i>Lb. plantarum</i> 118/37	VL	VR	HR
10 ml Lösungsmittel	VR	HR	HL
unbehandelt	HL	VL	VL

VR: rechtes Vorderviertel; HR: rechtes Hinterviertel; VL: linkes Vorderviertel; HL: linkes Hinterviertel

Tabelle 3 Behandlungsprotokoll zur Dosisfindung nach einmaliger intramammärer Applikation von drei Konzentrationen von Milchsäurebakterien.

Behandlung	Viertelposition		
	Tier 1	Tier 2	Tier 3
10 ml $1,01 \times 10^6$ KbE / ml <i>Lb. plantarum</i> 118/37	VL	VL	VR
10 ml $2,0 \times 10^6$ KbE / ml <i>Lb. plantarum</i> 118/37	HR	HR	HL
10 ml $3,0 \times 10^6$ KbE / ml <i>Lb. plantarum</i> 118/37	HL	VR	VL
unbehandelt	VR	HL	HR

VR: rechtes Vorderviertel; HR: rechtes Hinterviertel; VL: linkes Vorderviertel; HL: linkes Hinterviertel

3.2.4 Probenentnahme

Viertelanfangsgemelksproben wurden gemäß den DVG-Richtlinien aseptisch aus den betreffenden Eutervierteln gewonnen. Hierfür wurde die Zitze zunächst mit einem Papiertuch gereinigt. Nach Verwerfen der ersten Milchstrahlen und Desinfektion der Zitzenkuppe mit 70%igem Alkohol, wurde die Milch in ein steriles Probenröhrchen gemolken (DVG 2009). Alle Proben wurden bei 5°C gelagert und innerhalb von 12 h in das mikrobiologische Labor der Fakultät II der Hochschule Hannover transportiert. Die Milchprobenentnahme für den Gewebeverträglichkeitsversuch erfolgte unmittelbar vor und 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h und 7 Tage nach der Milchsäurebakterienapplikation. Im Dosisfindungsversuch wurden die Proben unmittelbar vor und 12 h, 24 h, 36 h, 60 – 72 h, und 6 Tage nach Behandlung mit der Lebendkultur gewonnen.

3.2.5 Bakteriologische Untersuchung und Zellzahlbestimmung

Die Milchproben wurden im mikrobiologischen Labor der Fakultät II der Hochschule Hannover einer konventionellen, bakteriologischen Untersuchung gemäß den DVG-Richtlinien unterzogen (DVG 2009). Dabei wurden die enthaltenen Erreger ermittelt und auch deren Ausscheidungsmenge mit einem semiquantitativen Verfahren bestimmt. Der Gehalt somatischer Zellen wurde im Durchflusszytometer („Somascope

Smart“, Delta Instruments B.V. Drachten, Niederlande) nach ISO 13366-2:2008 gemessen.

3.2.6 Differenzierung und Zählung der somatischen Zellen

Die Auszählung und Differenzierung der Leukozyten (Lymphozyten, Makrophagen und PMN) und Epithelzellen wurde mittels des mikroskopischen Referenzverfahrens nach ISO 13366-1:2008 durchgeführt

3.2.7 Nachweis von *Lb. plantarum* 118/37 aus Milchproben mittels RAPD- PCR

Um einen möglichen Nachweis von *Lb. plantarum* 118/37 in der Milch zu ermöglichen, wurden 2 x 0,1 ml der Milchprobe zunächst auf MRS-Agar (Merck, Darmstadt, Deutschland) ausgestrichen und bei 37°C für 48 h bebrütet. Vier Kolonien, die phänotypisch dem Wachstum von *Lb. plantarum* glichen, wurden pro Probe entnommen und auf Äskulin-Blut-Agar in Reinkultur überführt (37°C, 48 h).

Mit der RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) Methode wurden die Bandenmuster der replizierten Fragmente dieser Isolate mit denen von *Lb. plantarum* 118/37 verglichen (Gillespie et al. 1997). Eine Übereinstimmung wurde als Nachweis angesehen.

Hierfür wurde die DNA der gewonnenen Isolate mit einem einzelnen Primer amplifiziert und das entstehende Muster der DNA-Fragmente mit dem von *Lb. plantarum* 118/37 verglichen. Die DNA-Extraktion wurde mittels kommerziellen Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kits nach Herstellervorgaben durchgeführt.

Das Reaktionsvolumen (25 µl) für jeden PCR-Ansatz enthielt 12,5 µl Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), 5 µl DNA-Extrakt und 1 µl (100 pmol/µl) Primer OPE-04 (biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland) aufgefüllt mit Wasser (Water Molecular biology degrade BC; AppliChem, Darmstadt, Deutschland). Die Amplifikationen wurden in einem Stratagene Mx 3005P Thermocycler durchgeführt. Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet: Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 120 s, wurde der Thermocycler auf 95°C für 70 s, 33°C für 60 s und 72°C für 60 s eingestellt. Die Amplifikationen wurden in 35 Zyklen durchgeführt und die Abkühlungszeit von 95°C

auf 33°C betrug 150 s. Nach Färbung mit Midori Green Direct (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland) wurden die PCR-Produkte mittels 1,5%iger Agarosegel-Elektrophorese (100 V, 2 h) getrennt und anschließend durch UV-Illumination mit Gene Snap (Synergene, Cambridge, UK) visualisiert.

4 Publication I: *In-vitro* ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens

(*In-vitro* Hemmfähigkeit von Milchsäurebakterien gegenüber Euterpathogenen)

Ann-Christin Diepers¹, Volker Krömker¹, Claudia Zinke¹, Nicole Wente¹, Liying Pan¹, Kathrin Paulsen¹, Jan-Hendrik Paduch¹

¹ Mikrobiologie, Abteilung Bioverfahrenstechnik, Fakultät II, Hochschule Hannover

Sustainable Chemistry and Pharmacy (2016),

DOI: 10.1016/j.scp.2016.06.002

Veröffentlicht am 02. Juni 2016

4.1 Abstract

Bovine mastitis is one of the most important diseases in high-yielding dairy herds. Recently, the state-of-the-art treatment of mastitis has been that of antibiotic therapy. Due to increasing antibiotic resistance in pathogens, alternative and sustainable therapeutics have to be sought. Probiotic microorganisms possess such curative capabilities and therefore the aim of the present study was to isolate lactic acid bacteria (LAB) which are able to inhibit mastitis-causing pathogens *in-vitro*. 416 isolates of LAB were obtained from 1,532 samples (quarter foremilk samples, bulk milk, grass, manure and bedding materials). 367 isolated wild isolates, two reference strains (*Lactococcus (Lc.) lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus (Lb.) rhamnosus* ATCC 7469) and six combinations were screened with agar well diffusion assay for their ability to inhibit the growth of *Staphylococcus (S.) aureus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *Streptococcus (Sc.) uberis*, *Sc. agalactiae* and *Escherichia (E.) coli*. 170 wild isolates inhibited the growth of *Sc. uberis*, 78 *S. epidermidis*, 37 *S. aureus*, 36 *S. xylosus*, 14 *E. coli* and 13 *Sc. agalactiae*, respectively. Only the combination of the wild strains 78/37 (*Lb. paracasei*), 118/37 (*Lb. plantarum*) and the reference strains inhibited the growth of all six indicator pathogens. These four strains were further capable of growing in milk as a substrate and of adhering to teat canal epithelium cells *in-vitro*. It can be concluded that lactic acid bacteria may have the potential to be used as probiotics to prevent and to treat bovine intramammary infections in a more sustainable way in future.

5 zur Publikation vorbereitetes Manuskript: Initial assessment of tissue tolerability, duration of detectability and immune response after an intramammary infusion of *Lb. plantarum*

(Einleitende Untersuchungen der Gewebeerträglichkeit, Dauer der Nachweisbarkeit und Immunantwort nach intramammärer Applikation von *Lb. plantarum*)

Ann-Christin Diepers*¹, Jan-Hendrik Paduch*, Nicole Wente* and Volker Krömker*

**Department of Bioprocess Engineering and Microbiology, Hannover University of Applied Sciences, D-30453 Hannover, Germany*

5.1 Abstract

As bovine mastitis is the most influential infectious disease on dairy farms and the conventional antibiotic therapy is becoming more and more the subject of criticism, there is a need for alternative and sustainable treatment methods. In a previous *in-vitro* investigation, *Lactobacillus (Lb.) plantarum* 118/37 was isolated from milk and selected according to its potential probiotic properties. The present study represents the first *in-vivo* assessments of tissue tolerability and immune response after an intramammary infusion of 10 mL freeze-dried and resuspended *Lb. plantarum* with the concentration 10^4 and 10^6 cfu (colony-forming units) / mL. No signs of inflamed udder tissue, no elevation of the rectal temperature, a slight increase in SCC and only a temporary alteration of milk appearance were detected. For dose determination three doses of the lactic acid bacteria (LAB) strain (1.01×10^6 , 2.0×10^6 and 3.0×10^6 cfu /mL) were inoculated into the mammary gland of three clinically healthy cows, one quarter was left as control. Independent of dose, no signs of tissue inflammation or disturbance of

general condition were observed. In two quarters treated with 3.0×10^6 cfu / mL clots became visible 12 h post infusion (PI), but had disappeared by the next sampling. Infusion with a live culture leads to a rapid and considerable innate immune response. There was a significant increase in somatic cell count (SCC) 12h post infusion in every quarter regardless of the treatment. The most rapid and short-lived increase, with its peak at 12 PI was achieved with the high dose of the LAB. The SCC decreased after 1-3 days in every treated quarter and the average SCC was lower than at the beginning of the trial. The infusion of the live culture effects a recruitment of phagocytic cells, particularly neutrophils and macrophages. With the RAPD-PCR method it was possible to identify the infused *Lb. plantarum* 118/37 in the subsequently taken milk samples, but not longer than 36 h PI. The results obtained will serve as the basis for further trials to evaluate the potential of *Lb. plantarum* 118/37 for treating bovine mastitis.

Keywords: Lactobacillus, mastitis, treatment, immune response, tissue tolerability, probiotic

5.2 Introduction

Disease occurrence of mastitis continues to be a prevalent problem in the dairy industry. It can be assumed that there are 0.3 to 0.5 clinical mastitis cases per cow per year (Krömker 2007, Lam et al. 2013, Santman-Berends et al. 2015). The inflammation of the mammary gland is one of the most expensive and impairing diseases in dairy farming (Cha et al. 2011). The conventional method for controlling the incidence of mastitis is based upon prevention strategies like improved hygiene management, housing conditions, milking techniques, increased diagnosis, segregation of affected animals, and optimized treatment protocols. However, when a mastitis case occurs, the treatment opportunities are limited and rely heavily on the use of antibiotic formulations (Santman-Berends et al. 2015). There are many concerns arising regarding the use of antibiotics. There is not only the economic aspect that an antibiotic administration results in milk loss, as milk must be withheld from the dairy until the milk is free of residues, but also the aspect of sustainability regarding the increased

probability of resistance development to indigenous and exogenous microorganisms. Additionally, there are mastitis cases that do not respond to antibiotic treatment or cases that re-occur after a short time (Grieger et al. 2014, Hillerton and Kliem 2002, Pol and Ruegg 2007). Alongside improving mastitis prevention programs, the exploration of alternative treatment opportunities is important.

One approach is the greater involvement of the immune defense, for example, through vaccination (Leitner et al. 2003, Middleton et al. 2009), administration of lysostaphin (Oldham and Daley 1991), bacteriocins (Gillor et al. 2009, Lewus and Montville 1991, Pieterse and Todorov 2010b), cytokines (Alluwaimi 2004, Daley et al. 1993, Kauf et al. 2007), or new drug delivery systems such as liposomes, microparticles or nanoparticles (Gruet et al. 2001). In this context, the use of probiotic bacteria like lactic acid bacteria, which mainly are considered as safe (GRAS; Generally Recognized as Safe), was the focus of extensive research in the control of pathogenic microorganisms in recent years.

LAB are Gram-positive microorganisms that occur naturally in the environment of dairy cows and can be detected on teat epithelia, in bedding material, on plants and in milk (Chaimanee et al. 2009, Espeche et al. 2009). These bacteria have several characterizations which inhibit the growth of other microorganisms through, for example, production of organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl, bacteriocins or other antimicrobial compounds (Holzapfel and Wood 2014, S. 45-47). Of greater interest regarding administering LAB into the mammary gland is their ability to adhere to epithelial cells and their colonization, the competition for nutrients and especially the modulation of the host immune response (Crispie et al. 2008).

In a previous investigation, we described the inhibitory effects of LAB in *in-vitro* approaches (Diepers et al. 2016). In this study, the isolated and characterized LAB strain *Lactobacillus (Lb.) plantarum* 118/37 showed encouraging results in the inhibition of the indicator pathogens *Escherichia (E.) coli* DSM 4230, *Staphylococcus (S.) aureus* ATCC 12600, *Sc. uberis* ATCC 700407 and *S. epidermidis* 575/07, could adhere to bovine teat canal epithelial cells (BTCEC), showed no presence of genes related to antibiotic resistance and could survive and grow in milk as a substrate.

In a following step the impact of an *in-vivo* application must be examined. Previous studies reported that the use of a live culture for treating mastitis has several advantages (Beecher et al. 2009, Crispie et al. 2008, Frola et al. 2012a, Klostermann et al. 2008, Nagahata et al. 2015). There are not only the antimicrobial abilities, but also the immunomodulatory effect, characterized by a short-lived rise in SCC with a concomitant reduction or elimination of pathogens (Klostermann et al. 2008).

Gram-positive bacteria have been shown to act as an immune-response activator. Crispie et al. 2008 reported a local immune response after infusing *Lactococcus lactis* DPC3147 in the bovine mammary gland through a time-limited substantial recruitment of polymorphonucleocytes (PMN) and lymphocytes. Also, in a histological examination Frola et al. (2012) detected an increase in the amount of PMN in the epithelial zone of the mammary gland cistern and a mild inflammation shown through a blood vessel hyperemia, but no changes, necrosis or apoptosis of epithelial cells. Beecher et al. (2009) emphasized increased immune gene expression of the cytokines IL-1 β and IL-8 and the related rapid and considerable immune response. Klostermann et al. (2008) and Nagahata et al. (2015) demonstrated in experimental trials that treatment with a live culture of probiotic bacteria has comparable effects towards the clinical and bacteriological cure rate of bovine mastitis as does an antibiotic treatment.

For tolerability testing and dose finding the reaction of the udder tissue, the duration of LAB detection and the immunological response after a single application of a live culture of *Lb. plantarum* 118/37 into the bovine mammary gland were examined.

5.3 Material & Methods

5.3.1 Selection of the LAB strain and Preparation of live culture treatment

The *Lactobacillus* strain *Lb. plantarum* 118/37 (Microbiology Department of the University of Applied Sciences and Arts Hannover, Germany) used in this study was isolated from milk and characterized as potentially probiotic because of its ability to inhibit mastitis pathogens *in-vitro*, adhere to bovine teat canal epithelial cells, show no presence of genes related to antibiotic resistance and grow in milk as a substrate (Diepers et al. 2016). *Lb. plantarum* 118/37, stored in Man, Rogosa and Sharpe (MRS)

broth (Merck, Darmstadt, Germany) containing 20% glycerol at -80°C , were subcultured twice in MRS broth at 37°C for 24 h before preparation assay.

With the aim of developing a durable, quick applicable and compatible live culture therapeutically, a washed cell suspension was freeze-dried as follows: a culture of the strain *Lb. plantarum* 118/37 (1%, v/v) was grown in MRS broth at 37°C for 17 h. To obtain final application doses of 10^4 and 10^6 cfu/ mL after freeze-drying, the overnight culture was diluted with Ringer's solution (Merck, Darmstadt, Germany) to a concentration of 10^6 and 10^8 cfu / mL. The cells were subsequently enriched by centrifugation at $940 \times g$ for 10 min at 5°C (Hettich centrifuge, Rotixa RP, Amsterdam, the Netherlands) and the supernatant discarded. The cell pellet was then washed with 10 mL Ringer's solution, centrifuged again and after removal of the supernatant, finally suspended in 50 mL of a medium containing pyrogen-free Ringer's solution (B. Braun, Melsungen, Germany) (25%, v/v) and filtrated (0.2 μm pore size filter, Minisart, Sartorius AG, Göttingen, Germany) lactose (5%, w/v) diluted with pyrogen-free water (B. Braun, Melsungen, Germany). Each 1 mL of this suspension was filled in glass ampoules (Injection vials, 20 mL, Wheaton, USA) and was frozen at -80°C for 3 h. The frozen cell suspension was then freeze dried in an Alpha 1-2 LD plus freeze drier (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany) at 0.7 mbar and -24°C for 23 h. All ampoules were hermetically sealed and stored at -20°C .

Before treatment application, each freeze-dried pellet was resuspended with 10 mL of pyrogen-free Ringer-solution (25%, w/v), diluted with pyrogen-free water. These suspensions contained approximately two doses of viable *Lb. plantarum* 118/37 at a concentration of $5.1 \pm 0.3 \times 10^4$ cfu / mL and $6.1 \pm 1.7 \times 10^6$ cfu / mL (average of 10 different application doses). For dose determination studies the treatment doses were combined, doubled and tripled (1.01×10^6 cfu / mL, 2.0×10^6 cfu / mL, 3.0×10^6 cfu / mL) but the amount of resuspension solution remained 10 mL for application.

5.3.2 Selection of animals

Cows from a conventional dairy farm in Northern Germany, with approximately 170 lactating cows, mainly Holstein-Friesian, an average 305 days' lactation milk yield of

10,500 kg ECM (Energy Corrected Milk) and an average bulk milk somatic cell count of 200,000 cells / mL, were selected. All cows enrolled in this study were routinely milked twice a day. The pre-milking udder preparation consisted of manually forestripping and cleaning the teats with paper towels. Pre- and post-milking teat disinfection was carried out using an iodine-containing (3,000 ppm), foaming disinfectants. At the end of their lactation period, all cows were dried off abruptly and the teats were infused with long-acting antibiotics and an internal teat sealant. Following selection of suitable animals and udder quarters, the trial was conducted between December 2016 and April 2017.

Three Holstein Friesian cows were used for the preliminary tissue tolerability test of an intramammary infusion of *Lb. plantarum* 118/37 with two different low bacterial concentrations. As the extent of the effect on udder tissue and general condition was not definable at the start of the trial and the impairment of animal welfare and economic values should be kept to a minimum, three older clinically healthy cows (> 7th lactation) which should be removed from the herd within a short period of time were chosen.

Exclusion criteria were clinical mastitis cases, other visible diseases having an influence on the general condition, teat injuries, systemic or intramammary treatment with an antibiotic formulation in the previous 30 days or a milk yield of less than 5 kg a day.

For dose determination three clinical healthy cows were used (CMT <++, no swelling of the udder or visible abnormalities in the milk were present at the start of the trial). Exclusion criteria were the same as in the tissue tolerability test.

5.3.3 Treatment protocol (clinical observations and animal care)

For the tissue tolerability test, three quarters of each cow were infused with a suspension containing either 10 mL 10^4 cfu / mL (a) or 10^6 cfu / mL (b) of *Lb. plantarum* 118/37 or just the solvent (c), which was used to resuspend the freeze-dried bacteria. The fourth quarter remained untreated (d) (see Table 1).

For the dose determination study the three quarters of each cow were infused with a suspension containing either 10 mL 1.01×10^6 cfu / mL (A), 2.0×10^6 cfu / mL (B) or

3.0×10^6 cfu / mL (C) of *Lb. plantarum* 118/37. The remaining fourth quarter was used as control (D) (see Table 2).

After clinical examination of the udder and the milk, quarter milk samples were obtained under aseptic conditions and the respective treatment was chosen randomly. The freeze-dried *Lb. plantarum* 118/37 was resuspended with 10 mL of the solvent before treatment. The teat tips were disinfected with ethanol (70%) and the live culture was infused directly into the teat sinus via the streak canal. The infusions were performed after milking by means of a syringe with a blunted smoothed tip (17mm) to prevent teat injury.

A clinical assessment was performed after every subsequent milking. General condition and appetite were observed. The udders were palpated for swelling, hardness, soreness and heat and the appearance of milk was assessed visually for clots and changes in color or composition. Additional milk samples from every quarter were collected at the sampling-times according to the milk sampling protocol.

5.3.4 Milk sampling protocol

Foremilk samples were taken aseptically after cleaning teat ends with a paper towel, disinfecting the teat tip with ethanol (70%) and discarding the first milk streams (DVG 2009). All samples were transported within 12 h at 5°C to the microbiology laboratory of the University of Applied Sciences and Arts Hannover (Germany).

For the tissue tolerability test, milk samples were taken prior to treatment and 12 h, 24 h, 36h, 48 h, 72 h and 7 days after applying *Lb. plantarum* 118/37.

For dose determination, the samples were taken 12 h, 24 h, 36 h, 60-72 h, and 6 days after treatment with the live culture.

5.3.5 Microbiological assessment and somatic cell count

The microbiological milk samples diagnostic based on DVG-guidelines (DVG 2009) was performed in the microbiology laboratory of the University of Applied Sciences and Arts Hannover (Germany). The quantity of somatic cells was determined in a flow cytometer ("Somscope Smart", Delta Instruments B.V. Drachten, the Netherlands) in accordance with ISO 13366-2:2008 guidelines.

5.3.6 Analysis and differentiation of somatic cells present in milk

The enumeration of the leucocytes (lymphocytes, macrophages and PMN) and epithelial cells was carried out with the microscopic reference method (ISO 13366-1:2008).

5.3.7 Detection of *Lb. plantarum* 118/37 in milk samples with RAPD-PCR

To detect *Lb. plantarum* 118/37 in milk, 0.1 mL of each sample were first streaked in duplicate on MRS agar plates (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 37°C for 48 h. Four representative colonies of all morphologies were arbitrarily selected from the plates and purified on aesculin blood agar, aerobically at 37°C, for 48 h.

To evaluate bacterial DNA for species identification, RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) fingerprinting was performed as described by Gillespie et al. (1997) with some modifications. Deviating from the described method, DNA extractions were performed by using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit with the manufacturer's protocol. Amplifications were carried out in a Stratagene Mx 3005P Thermocycler (Agilent Technologies, Santa Clara, United States). For each PCR assay, 25 µl reaction volume, containing 12.5 µl Fast Start Universal SYBR Green Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 5 µl DNA and 1 µl (100 pmol / µl) Primer OPE-04 (biomers.net GmbH, Ulm, Germany) filled up with water (water molecular biology degrade BC; AppliChem, Darmstadt, Germany), were used. To ensure reproducibility and to detect contamination, two controls were used in each RAPD assay. The negative control contained all components of the PCR reaction except DNA. The positive control contained all components of the PCR reaction and 5 µl of DNA from *Lb. plantarum* 118/37. Following an initial denaturation step at 95°C for 120 s, parameters for the thermocycler were set at 95°C for 70 s, 33°C for 60 s, and 72° C for 60 s. Thirty-five cycles of DNA amplification were performed. Cooling time from 95°C to 33°C was 150 s. After staining with Midori Green Direct (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Germany), detection of these PCR products was performed

using 1.5 % agarose gel electrophoresis (100 V, 2h) and a subsequent visualization by UV illumination using Gene Snap (Synergene, Cambridge, UK).

5.4 Results

5.4.1 Tissue tolerability test: clinical observations, SCC response and microbiological development in cows 193, 475 and 312

No signs of udder inflammation like swelling, heat or pain on palpation or an elevation of the body temperature were observed in the three cows during the trial, no antibiotic intervention was required. The quarters treated with 10^4 cfu / mL of *Lb. plantarum* 118/37 did not show signs of udder inflammation, besides a transient appearance of clots in the milk of Cow 312 (24 h PI). In contrast, the LAB infusion at a concentration of 10^6 cfu / mL caused flocculation in every treated quarter. The treated quarter of Cow 312 and 193 showed clots 36 and 48 h after infusion, respectively, which were no longer visible at the next sampling. In the quarter milk sample of Cow 475 clots became visible 12 h after application of the higher dose of the LAB and were still present at the end of the trial. The measured SCC in this quarter was elevated before treatment. No clots became visible during the trial in the untreated control quarters and the quarters treated with the solvent, except the solvent treated quarter of Cow 312, in which *Sc. uberis* were detected at the time of clot occurrence.

Summing up the SCC response, those quarters challenged with a LAB concentration of 10^4 cfu / mL showed a transient increase in SCC, which decreased approximately to the initial value (see Figures 2-4). Quarters treated with a bacterial concentration of 10^6 cfu / mL had a higher SCC at the beginning of the trial and therefore indistinct increases in SCC after infusion. Cow 193, with a relatively low SCC at the beginning of the assessment, showed the strongest increase (nearly 100- fold) 12 h after inoculation. Invading cells were mainly PMN, followed by macrophages and lymphocytes. The decrease of the SCC in the quarters treated with the high dose was more rapid than in the low dose quarters. In the quarters treated with the solvent or left untreated the SCC remained relatively unchanged except for a slight, simultaneous increase in somatic cells 12 - 36 h PI.

To determine a timeframe for detecting the infused LAB, isolated microorganisms were examined using the RAPD-DNA method. The band pattern of 12 isolates, recovered from the recent milk samples 12 – 24 h PI, were identical with the band pattern of the positive control *Lb. plantarum* 118/37. Only in one sample obtained 36 h after application *Lb. plantarum* 118/37 were recovered with this method.

5.4.2 Dose determination study: clinical observations, SCC response and microbiological development in cows 108, 97 and 513

For the dose determination study an up to three times higher concentration than in the tissue tolerability test was used. Therefore, the three quarters of each cow were infused with a suspension containing either 10 mL 1.01×10^6 , 2.0×10^6 or 3.0×10^6 cfu / mL of *Lb. plantarum* 118/37. The remaining fourth quarter was used as control.

Clinical response

In the nine quarters treated with the live culture no signs of inflamed udder tissue (swelling, hardness, soreness or heat) or disturbance of the general condition were detected. In two quarters, clots in milk became visible 12 h after infusion of 3.0×10^6 cfu / mL *Lb. plantarum* 118/37 (Cows 97 and 513), which were no longer detectable at the next sampling 24 h PI. Cow 108 did not show any clots in milk shortly after the LAB infusion, but at day 6 clots became visible in the quarter treated with 3.0×10^6 cfu / mL of *Lb. plantarum* at the outset.

SCC-Response

Overall, a significant increase in SCC (Wilcoxon-Test, $p=0.0096$) in quarter milk were found 12 h post infusion in every examined quarter regardless of the treatment. Even the untreated control quarters showed a slight increase in SCC (see Figures 5-7). This effect was not demonstrable at the subsequent samplings. The elevated SCC values decreased after 1-3 days. The quarters treated with the 3.0×10^6 cfu /mL *Lb. plantarum* showed the highest immune response in terms of SCC rise through a rapid SCC increase with its peak at 12 h post infusion and a decrease to nearly the initial value at 24 h PI. Quarters treated with the lower doses of LAB (1.01 and 2.0×10^6 cfu /ml *Lb.*

plantarum) had the SCC peak at 24 h after application and the decrease took 2- 3 days.

The quarter treated with the high dose of LAB of Cow 108 showed a sudden increase in SCC at day 6, possibly due to a new infection. Ignoring this fact, the average SCC of the infused quarters decreased under the average pre-infused values.

Immunological Response-Types of somatic cells in milk

To determine whether viable *Lb. plantarum* were required to produce an adequate immune response and what this response looks like, the type of invading cells was examined. Overall, a rapid rise in PMN could be seen 12 h after treatment, especially after the high dose treatment (C) of *Lb. plantarum* 118/37 (see Figure 8). The number of macrophages rose to a smaller extent 12 h after LAB application (see Figure 9). Only a small number of lymphocytes invaded in the milk 12-36 h after treatment with the LAB (see Figure 10).

*Detection of *Lb. plantarum* 118/37 in milk samples*

With the RAPD-PCR method it was possible to recover the infused LAB strain *Lb. plantarum* 118/37 in the subsequently taken milk samples (see Figure 1). In this trial, high numbers of lactobacilli were found in two thirds of the treated quarters (n = 9) regardless of the infused microorganism dose at the first milking post infusion. *Lb. plantarum* 118/37 was no longer detectable in any of the treated udder quarters after 36 h. However, the infused LAB strain was additionally found in one quarter used as control, 12 and 24h after infusion.

5.5 Discussion

This study was initiated to evaluate the tolerance of the udder tissue, the immunological response and the duration of LAB detection after a single application of viable *Lb. plantarum* 118/37 into the bovine mammary gland. Additionally, three different concentrations of the LAB were tested to determine a suitable application dose.

As initially mentioned, *Lactobacilli* and their potential use in the food and medical sectors has become a focal point of interest in the last two decades. Several studies of *in-vitro* assays for inhibition and probiotic ability show the unexploited potential of these microorganisms (Chaimanee et al. 2009, Espeche et al. 2012, 2009, Millette et al. 2007, Piccart et al. 2016). To design a health-promoting product of a live culture some parameters should be considered to exert a potential positive effect. Among these, the origin of the strains, the capability to produce antagonistic substances, adhesion to host tissues and no evidence of antimicrobial resistance are the most important (Frola et al. 2012a). To use these advantages to prevent and treat bovine udder diseases, the tolerability of the tissue and the immunological response must be evaluated first, especially in terms of dose determination.

In a previous investigation, the LAB strain *Lb. plantarum* 118/37 was isolated and selected due to its beneficial properties for further studies. An application matrix had to be developed to enable a durable storage under conventional cooling devices and a quick reactivation of the live culture for experimental trials. Moreover, the maintenance of the LAB's beneficial properties and the warranty of comparable numbers of viable microorganisms must be given. These requirements were fulfilled by the freeze-drying process. Carvalho et al. (2004) mentioned that the optimal freezing protocol must be checked for every strain to guarantee their potential to survive and the stabilization of their metabolic activity. Therefore, the survival conditions during freeze-drying in different media were assessed, taking into consideration that the freeze-drying medium should contain as little as possible of substances that may irritate the udder tissue (data not shown). By adding lactose to diluted, pyrogen-free Ringers solution, used as drying medium, higher survival rates could be achieved (data not shown). Lactose has already been tested for its protective effect during drying and subsequent storage of the LAB. It can be used as a carbon source by the microorganisms, occurs naturally in the udder and is used in pharmaceutical formulas based on powders to increase their solubility. Through this preparation of *Lb. plantarum* 118/37 it was possible to create application doses which contained a defined number of viable bacteria.

To define the different test doses, references from previous investigations and technological feasibility were considered. Frola (2012) estimated that 10^6 cfu/mL of *Lb. perolens* CRL 1724 was the highest lactobacilli concentration that did not produce long-term udder inflammation or alteration of milk. Crispie (2008) stated that a dose of $>10^3$ cfu / mL of *Lc. lactis* DPC 3147 is required to exert an appropriate immune response. Therefore, the chosen doses for the first tolerability test were set at 10^4 and 10^6 cfu / mL of *Lb. plantarum* 118/37.

Under laboratory conditions, there are no representable tests that can display the complexity of the tissue and immune reaction. Hence, it should be examined in a secured *in-vitro* study, taking the gained results as a starting point. As this LAB strain was inoculated for the first time in higher concentrations into the bovine mammary gland and tissue reaction could only be predicted from similar *Lactobacilli* investigations, the inoculation was implemented first on three animals with a high lactation number to minimize the potential ecological and ethical losses. No effects on general condition and tissue integrity were detected. Only a short alteration of the milk was found in the quarters treated with 10^6 cfu / mL of *Lb. plantarum* 118/37. Cow 193 showed an expected SCC profile with a short-lived increase after application that were strongest with the higher dose of the LAB, whereas the quarter treated with the resuspension solution and the control quarter showed only a slight increase in SCC. The other two Cows had an elevated SCC at the beginning of the trial and the immunological response was not this consistent. This poses the question whether the aspired immune reaction is not that effective with older, damaged tissue with a lower regeneration capacity.

With the RAPD-DNA method it was possible to recover the inoculated LAB strain from milk, which helps to determine a time-frame for viability and establishing *Lb. plantarum* 118/37 in the mammary gland. A detection was no longer possible after 36 h and no association between the LAB dose and detectability could be made.

After noticing that the concentrations of 10^4 and 10^6 cfu / mL of *Lb. plantarum* 118/37 were well tolerated by the animals, further studies were planned to find an optimal treatment dose. According to the recommendations of the European Medical Association (EMA 2016) three different concentrations were set for dose determination

(1.01×10^6 , 2.0×10^6 and 3.0×10^6 cfu/mL of *Lb. plantarum* 118/37) compared with a negative control. Three clinically healthy cows were selected. Although the numbers were very small, this investigation can be considered as a first approach to defining the pharmacodynamics.

A rise in SCC was found in every quarter, 12 h after inoculation of the LAB, even in the untreated control quarter. The short-term invasion of the somatic cells was most significant with the highest dose of 3.0×10^6 cfu / mL. In terms of mastitis detection, the increase of SCC is defined as illness syndrome and therefore associated with a negative development. But, nonetheless, the invasion of somatic cells is a mechanism of tissue defense, which can be exploited for new treatment options rather than to direct bacterial inhibition (Rainard and Riollot 2006). The ability of naturally eliminating infections through the intramammary immune system depends on a rapid and competent response to pathogens (Hertl et al. 2010, Mehrzad et al. 2010, Schukken et al. 1997) Some pathogens, most notably *Staphylococcus aureus*, can evade to the immune system by surviving intracellularly in PMN or epithelial cells (Crispie et al. 2008, Petzl et al. 2008). By triggering the immune response through other microorganisms this mechanism of avoiding a phagocytotic elimination might be impaired. Additionally, Beecher et al. (2009) stated that the immune profile elicited by gram-positive lactic acid bacteria is distinctly different from pathogen assault. In their presented study, *Lc. lactis* DPC 3147, in contrast to major mastitis pathogens, could upregulate cytokines and chemokines to a necessary amount for successful defense against mammary pathogens. After the inoculation of 3×10^6 cfu / mL, changes in the milk appearance (clots) were observed 12 h after application. These changes disappeared 24 h after inoculation. Indeed, no clots were visible at the lower doses, but with respect to an aimed rapid immune response the lower doses elicited a slower invasion of immune cells with a SCC peak after 24 - 36 h. After applying the high dose the SCC decreased to normal values after 24-36 h, while this took 2 -3 days with the lower doses. Noteworthy was also the fact that the average SCC at the end of the trial at day 6 was lower than at the beginning, with respect to a rapidly high SCC rise of the left hindquarter of Cow 108 at day 6, which might be triggered by a new infection.

The decrease probably reflected the inability of *Lb. plantarum* 118/37 to establish in the treated quarters and give guidance for striving treatment intervals. Supporting this theory, the infused LAB strain was no longer detectable after 36 h in milk through RAPD-PCR. This process does not reflect the entire udder microbiota through the inevitably small window of milk sampling. However, the comparison of the high number of proven *Lb. plantarum* 118/37 12 h after application with no evidence after 36 h, allows the conclusion to be drawn that this LAB strain cannot establish itself in the mammary gland.

The control quarters exhibited a negligible increase in SCC although no infusion was administered. These increases were also found in previous investigations and were most likely explained by cross-talk between the quarters (Crispie et al. 2008). Another explanation might be cross-contamination as *Lb. plantarum* 118/37 was identified in one control quarter 12 and 24 h after application. Crispie et al. (2008) reported that the primary phagocytic cells of the bovine mammary gland, polymorphonucleocytes and macrophages, comprise the first line of defense against invading bacteria. In our investigation, the differentiation and enumeration of the somatic cells show that PMN and macrophages invaded rapidly by one decimal power 12 – 24 h after infusion of the LAB. Numbers of lymphocytes rose just to a small extent.

The results of the immunological assays presented here support the theory that intramammary treatment with *Lb. plantarum* triggers the influx of neutrophils, thus providing the mammary gland with an enhanced mechanism for eliminating mastitis pathogens (Mehrzahl et al. 2010). However, further tests should be made to verify if the enhanced expression of proinflammatory substances is beneficial for the animal through better recognition of bacteria or whether it results in a too strong inflammatory response (Petzl et al. 2008). Additionally, the effect in inflamed tissue, with already high numbers of SCC, should be tested.

The concentration of 3×10^6 cfu /mL should be selected for further assays because this lactobacilli concentration elicited a short-lived, strong immune response (12 h) but did not produce any long-term udder inflammation or a systemic response.

In further studies, the application interval and treatment duration of this live culture treatment should be determined. In a final, larger trial involving reliable numbers of

clinical mastitis cases, the efficacy of this treatment method should be examined compared to an antibiotic treatment.

5.6 Conclusion

The results obtained in this study demonstrate the tissue tolerability of *Lb. plantarum* 118/37 when administered into the bovine mammary gland. The infusion resulted in a short-term increase in SCC, based on the invasion of phagocytic cells. The results suggested that one important mechanism for treating mastitis with a live culture was associated with stimulation of the host immune system. Most effective results could be achieved with a dose of 3.0×10^6 cfu / mL of *Lb. plantarum* 118/37. The strain could be recovered for 36 h from quarter milk samples and was then displaced. LAB may be a possible approach for a non-antibiotic treatment of mastitis.

5.7 Acknowledgements

This study was financially supported by EFRE and Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU). The authors would like to thank the laboratory personnel and all involved persons of the working group Microbiology of Hannover University of Applied Sciences.

5.8 Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

5.9 References

- Alluwaimi, A.M. (2004): The cytokines of bovine mammary gland: Prospects for diagnosis and therapy. *Res. Vet. Sci.* 77, 211–222
- Beecher, C., Daly, M., Berry, D.P., Klostermann, K., Flynn, J., Meaney, W., Hill, C., McCarthy, T. V, Ross, R.P., Giblin, L. (2009): Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host

immune response, particularly IL-1beta and IL-8 gene expression. *J. Dairy Res.* 76, 340–348

Berry, D.P., Meaney, W.J. (2006): Interdependence and distribution of subclinical mastitis and intramammary infection among udder quarters in dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 75, 81–91

Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P. (2004): Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 14, 835–847

Cha, E., Bar, D., Hertl, J. a, Tauer, L.W., Bennett, G., González, R.N., Schukken, Y.H., Welcome, F.L., Gröhn, Y.T. (2011): The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming. *J. Dairy Sci.* 94, 4476–4487

Chaimanee, V., Sakulsingharoj, C., Deejing, S., Seetakoses, P., Niamsup, P. (2009): Screening and characterization of bacteriocin-producing bacteria capable of inhibiting the growth of bovine mastitis. *Maejo Int. J. Sci. Technol.* 3, 43–52

Crispie, F., Alonso-Gómez, M., O'Loughlin, C., Klostermann, K., Flynn, J., Arkins, S., Meaney, W., Ross, R.P., Hill, C. (2008): Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live *lactococci* on the mammary immune response. *J. Dairy Res.* 75, 374–384

Daley, M., Williams, T., Coyle, P., Furda, G., Dougherty, R., Hayes, P. (1993): Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* infections with recombinant cytokines. *Cytokine* 5, 276–284

Diepers, A.-C., Krömker, V., Zinke, C., Wente, N., Pan, L., Paulsen, K., Paduch, J.-H. (2016): *In-vitro* ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens. *Sustain. Chem. Pharm.* 0–1

DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V) (2009) Leitlinien Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung von Mastitiserregern. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen. 2. Auflage. Verlag der DVG e.V., Gießen

EMA (European Medicines Agency) (2016): Guideline on the conduct of efficacy studies for intramammary products for use in cattle. EMA, London

- Espeche, M.C., Otero, M.C., Sesma, F., Nader-Macias, M.E.F. (2009): Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Vet. Microbiol.* 135, 346–357
- Espeche, M.C., Pellegrino, M., Frola, I., Larriestra, A., Bogni, C., Nader-Macías, M.E.F. (2012): Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe* 18, 103–109
- Frola, I.D., Pellegrino, M.S., Espeche, M.C., Giraud, J. a, Nader-Macias, M.E., Bogni, C.I. (2012): Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders. *J. Dairy Res.* 79, 84–92
- Gillespie, B.E., Jayarao, B.M., Oliver, S.P. (1997): Identification of *Streptococcus* species by randomly amplified polymorphic deoxyribonucleic acid fingerprinting. *J. Dairy Sci.* 80, 471–476
- Gillor, O., Etzion, A., Riley, M.A. (2009): The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol.* 81, 591–606
- Grieger, A., Paduch, J., Hoedemaker, M., Krömker, V. (2014): Rezidivierende klinische Mastitiden bei Milchkühen – Bedeutung und Ursachen. *Tierärztliche Prax. Großtiere* 156–162.
- Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., Kaltsatos, V. (2001): Bovine mastitis and intramammary drug delivery: Review and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50, 245–259
- Hertl, J. a, Gröhn, Y.T., Leach, J.D.G., Bar, D., Bennett, G.J., González, R.N., Rauch, B.J., Welcome, F.L., Tauer, L.W., Schukken, Y.H. (2010): Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 1551–1560
- Hillerton, J.E., Kliem, K.E. (2002): Effective Treatment of *Streptococcus uberis* Clinical Mastitis to Minimize the Use of Antibiotics. *J. Dairy Sci.* 85, 1009–1014
- Holzappel, W.H., Wood, B.J. (2014): Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp, 45-47

- Kauf, a. C.W., Vinyard, B.T., Bannerman, D.D. (2007): Effect of intramammary infusion of bacterial lipopolysaccharide on experimentally induced *Staphylococcus aureus* intramammary infection. Res. Vet. Sci. 82, 39–46
- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R.P., Hill, C., Meaney, W. (2008): Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. J. Dairy Res. 75, 365–373
- Krömker (2007): Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Enke Verlag, Stuttgart, p. 50
- Lam, T.J.G.M., van den Borne, B.H.P., Jansen, J., Huijps, K., van Veersen, J.C.L., van Schaik, G., Hogeveen, H. (2013): Improving bovine udder health: a national mastitis control program in the Netherlands. J. Dairy Sci. 96, 1301–1311
- Leitner, G., Lubashevsky, E., Trainin, Z. (2003): *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows, composition and evaluation of its immunogenicity in a mouse model. Vet. Immunol. Immunopathol. 93, 159–167
- Lewus, C.B., Montville, T.J. (1991): Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. J. Microbiol. Methods 13, 145–150
- Linder, M., Paduch, J., Grieger, A., Mansion-de, E., Knorr, N., Zinke, C., Teich, K. (2013): Heilungsraten chronischer subklinischer *Staphylococcus aureus* -Mastitiden nach antibiotischer Therapie bei laktierenden Milchkühen. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 126 7/8, 291–296
- Mehrzad, J., Paape, M., Burvenich, C. (2010): Role of neutrophils in protection of udder from infection in high yielding dairy cows. Iran. J. Vet. Res. 11, 102–111
- Middleton, J.R., Luby, C.D., Adams, D.S. (2009): Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: A review and new data. Vet. Microbiol. 134, 192–198
- Millette, M., Luquet, F.M., Lacroix, M. (2007): *In-vitro* growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* fermented milk. Lett. Appl. Microbiol. 44, 314–319
- Nagahata, H., Horiguchi, M., Tamiya, S., Gondaira, S., Higuchi, H., Kawai, K. (2015): Intramammary infusion of lactic acid bacteria and therapeutic effects on mastitis in dairy cows, in: Venglovský, J., Gregová, G., Čornejová, T. (Eds.), XVII International Congress

on Animal Hygiene 2015. University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Košice, Slovakia, Congr. Proc. pp. 132–133

Oldham, E.R., Daley, M.J. (1991): Lysostaphin: use of a recombinant bactericidal enzyme as a mastitis therapeutic. *J. Dairy Sci.* 74, 4175–4182

Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Yang, W., Seyfert, H.M., Nürnberg, G., Schubert, H.J. (2008): *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet. Res.* 39

Piccart, K., Vásquez, A., Piepers, S., De Vliegher, S., Olofsson, T.C. (2016): Short communication: Lactic acid bacteria from the honeybee inhibit the *in-vitro* growth of mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 2, 1–5

Pieterse, R., Todorov, S.D. (2010): Bacteriocins – Exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment. *Brazilian J. Microbiol.* 542–562

Pol, M., Ruegg, P.L. (2007): Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *J. Dairy Sci.* 90, 249–261

Rainard, P., Riollet, C. (2006): Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37, 369–400

Sandgren, C.H., Waller, K.P., Emanuelson, U. (2008): Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. *Vet. J.* 175, 108–117

Santman-Berends, I.M.G.A., Lam, T.J.G.M., Keurentjes, J., van Schaik, G. (2015): An estimation of the clinical mastitis incidence per 100 cows per year based on routinely collected herd data. *J. Dairy Sci.* 98, 6965–6977

Schukken, Y.H., Lam, T.J.G.M., Barkema, H.W. (1997): Towards a better udder health: the biological basis for selection on udder health traits. in: 48th EAAP Annu. Meet., Vienna 1997, Congr. Proc. pp. 1–10

5.10 Appendix

Table 1 Treatment protocol to examine tissue tolerability of a single intramammary infusion of *Lb. plantarum* 118/37.

Treatment	Udder quarter		
	Cow 1	Cow 2	Cow 3
10 mL 10 ⁴ KbE / ml <i>Lb. plantarum</i> 118/37	RH	LH	RF
10 mL 10 ⁶ KbE / ml <i>Lb. plantarum</i> 118/37	LF	RF	RH
10 mL solvent	RF	RH	LH
no treatment	LH	LF	LF

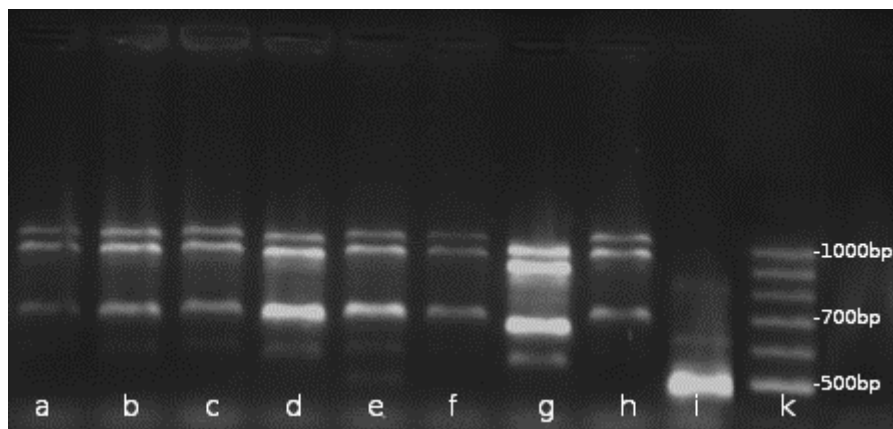
RF: right forequarter; RH: right hindquarter; LF: left forequarter; LH: left hindquarter

Table 2 Treatment protocol for dose finding after a single intramammary infusion of *Lb. plantarum* 118/37.

Treatment	Udder quarter		
	Cow 1	Cow 2	Cow 3
10 mL 1.01 x 10 ⁶ KbE / ml <i>Lb. plantarum</i> 118/37	LF	LF	RF
10 mL 2.0 x 10 ⁶ KbE / ml <i>Lb. plantarum</i> 118/37	RH	RH	LH
10 mL 3.0 x 10 ⁶ KbE / ml <i>Lb. plantarum</i> 118/37	LH	RF	LF
no treatment	RF	LH	RH

RF: right forequarter; RH: right hindquarter; LF: left forequarter; LH: left hindquarter

Figure 1 RAPD-PCR patterns from 8 isolates (b-i) out of milk samples, obtained with primer OPE-04, compared to *Lb. plantarum* 118/37 (a) and molecular mass marker (k).



Figures 2-4 Somatic cell count ($\times 10^3$ cells / mL) in quarters following infusion with *Lb. plantarum* 118/37 at a concentration of 10^4 cfu / mL (a), 10^6 cfu / mL (b) compared with an infusion of the solvent (c) or no infusion (d) as control.

Figure 2 Cow 193

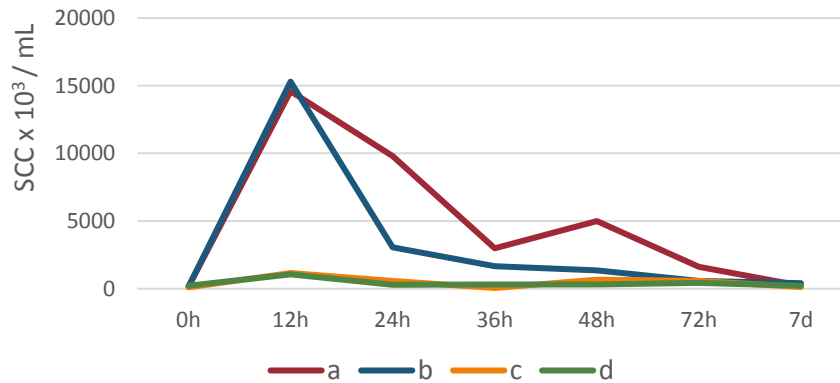


Figure 3 Cow 475

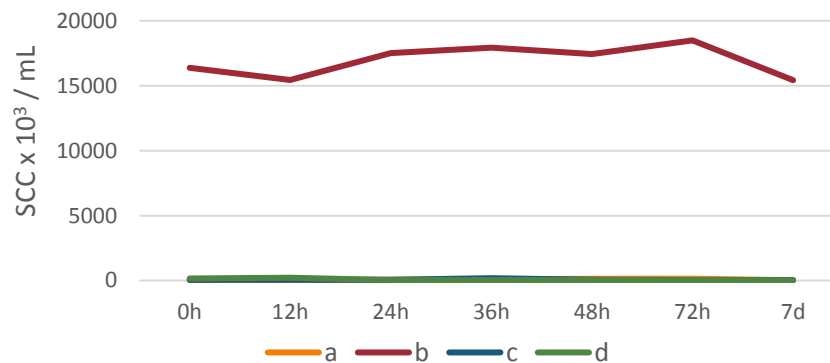
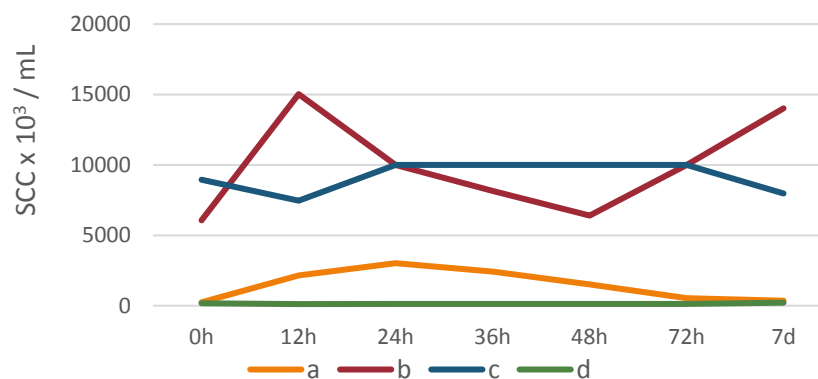


Figure 4 Cow 312



Figures 5-7 Somatic cell count ($\times 10^3$ cells / mL) in quarters following infusion with *Lb. plantarum* 118/37 at a concentration of 1.01×10^6 cfu / mL (A), 2.0×10^6 cfu / mL (B) and 3.0×10^6 cfu / mL (C) compared with no infusion (D) as control.

Figure 5 Cow 108

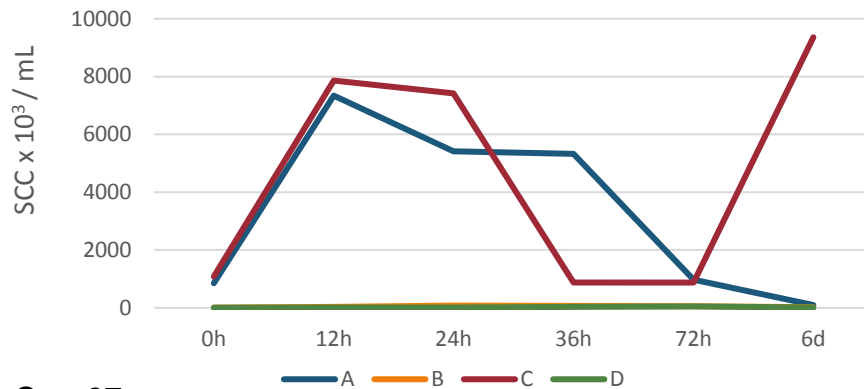


Figure 6 Cow 97

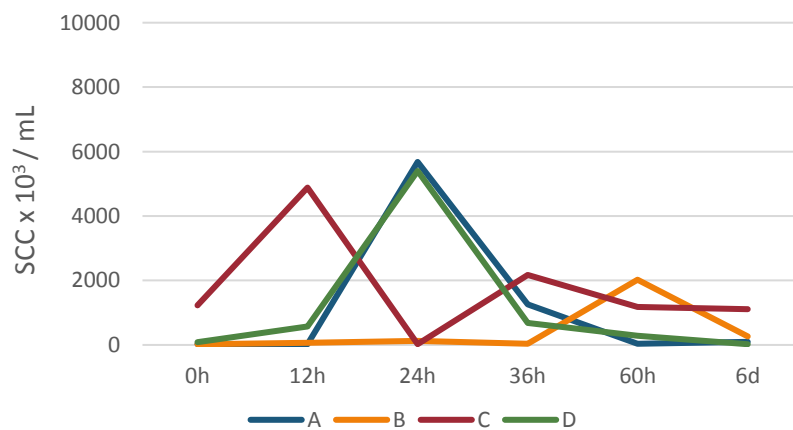


Figure 7 Cow 513

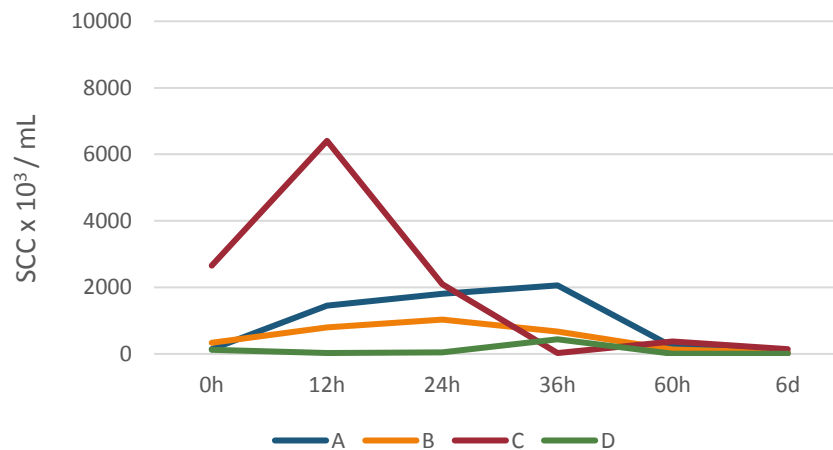


Figure 8 Number of PMN in milk before and after intramammary infusion of *Lb. plantarum* 118/37 at a concentration of 1.01×10^6 cfu / mL (A), 2.0×10^6 cfu / mL (B); and $3,0 \times 10^6$ cfu / mL (C). One quarter in each cow was left untreated as control (D).

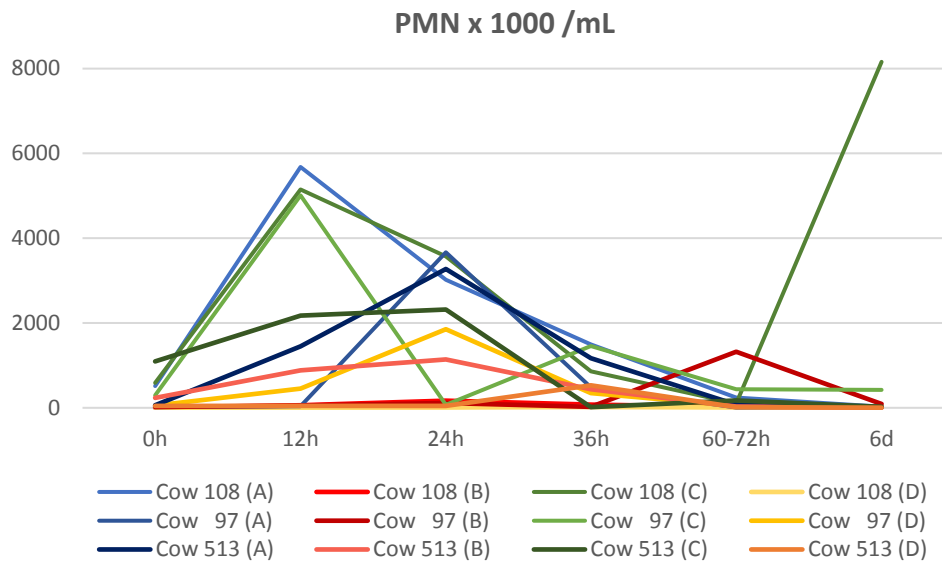


Figure 9 Number of macrophages in milk before and after intramammary infusion of *Lb. plantarum* 118/37 at a concentration of 1.01×10^6 cfu / mL (A), 2.0×10^6 cfu / mL (B); and $3,0 \times 10^6$ cfu / mL (C). One quarter in each cow was left untreated as control (D).

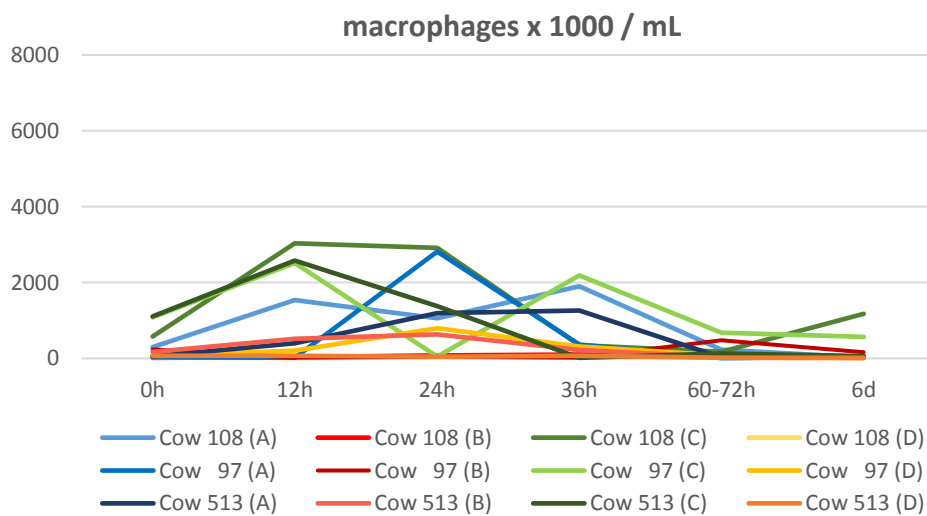
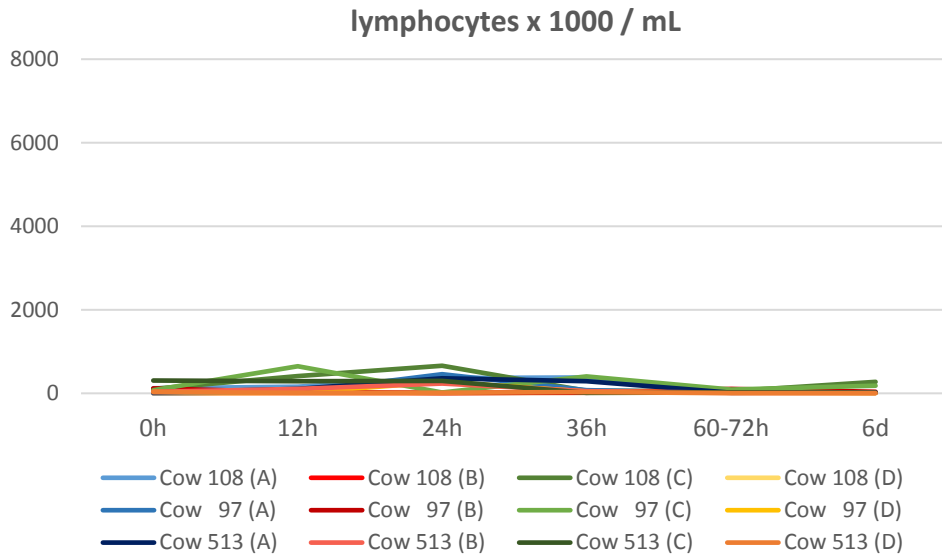


Figure 10 Number of lymphocytes in milk before and after intramammary infusion of *Lb. plantarum* 118/37 at a concentration of 1.01×10^6 cfu / mL (A), 2.0×10^6 cfu / mL (B); and $3,0 \times 10^6$ cfu / mL (C). One quarter in each cow was left untreated as control (D).



6 Diskussion

Der Einsatz probiotischer Mikroorganismen, speziell der Milchsäurebakterien, zur Prävention oder Therapie von bakteriellen Infektionen wurde in den letzten Jahrzehnten vermehrt untersucht (Chaimanee et al. 2009, Klostermann et al. 2008, Piccart et al. 2016, Reid und Burton 2002). Grundlegend für diesen Ansatz sind neben der Produktion antimikrobieller Substanzen, das natürliche Vorkommen auf Schleimhäuten von Mensch und Tier und die allgemeine Einstufung, dass es sich um eine weitgehend sichere Mikroorganismengruppe handelt, deren positiven Eigenschaften ausbauend genutzt werden können (Beasley 2004, Douillard und Vos 2014, Hill 2010).

Diese Arbeit soll dazu beitragen, die antimikrobielle Wirkung von Milchsäurebakterien und die Eignung für eine Anwendung am Euter aufzuzeigen, um eine Basis für ein mögliches, alternatives Therapeutikum zur Behandlung boviner Mastitiden zu schaffen.

6.1 Isolierung von Milchsäurebakterien

Die Isolation der Milchsäurebakterien erfolgte aus dem bovinen Umfeld. Die Proben (Viertelanfangsgemelksproben, Einstreu, Gras und Gülle) sollen das natürliche Vorkommen der Mikroorganismen im und in der Nähe des potentiellen Zielgewebes widerspiegeln, um mögliche Vorteile einer besseren Anpassungsfähigkeit und damit einer Überlegenheit gegenüber anderen Mikroorganismen zu nutzen (Espeche et al. 2009). Espeche et al. (2012) führen weiter auf, dass für den erfolgreichen Einsatz probiotischer Mikroorganismen eine Spezifität für den jeweiligen Wirtsorganismus notwendig ist. Als Negativbeispiel für eine schlechte Anpassung wird hier eine Studie von Greene et al. (1991) zitiert, in welcher aus der Kälberfütterung gewonnene Milchsäurebakterien für die Therapie von Euterentzündungen verwendet werden. Vergleicht man die Genome von Milchsäurebakterien, so lässt sich deren Herkunft aufgrund eines „nischen-spezifischen Gen-Sets“ von neun Genen, bestimmen, was die Spezifität dieser Mikroorganismen verdeutlichen soll (O’Sullivan et al. 2009).

Die Isolierung erfolgte größtenteils aus Viertelanfangsgemelksproben eutergesunder Kühe. Zwar konnten auch aus Umweltproben Milchsäurebakterienisolate gewonnen werden, allerdings erwiesen sich diese Isolate in den weiteren Untersuchungen als weniger geeignet, da sie nicht in der Lage waren euterpathogene Mikroorganismen zu hemmen. Es wurden nur Milchproben eutergesunder Tiere verwendet, um die Isolation von potenziell pathogenen Milchsäurebakterien zu vermeiden (siehe 6.3). Noch ungeklärt bleibt die Frage, ob mögliche Zusammenhänge zwischen guter Eutergesundheit und dem Vorkommen stabilisierender Mikroorganismen bestehen. Durch das multifaktorielle Entstehen einer Euterentzündung, lässt sich dieser Zusammenhang allerdings schwer überprüfen.

6.2 Prüfung auf antimikrobielle Eigenschaften

In den hier dargestellten Untersuchungen wurde das Screening auf antimikrobielle Aktivität mittels Well-Diffusionstest ermittelt. Durch die schrittweise durchgeführte Modifizierung der zu testenden Bakterienlösung, wie pH-Wert Neutralisierung oder Zugabe von Enzymen (Katalase, Pepsin, oder Trypsin) kann der Hemmmechanismus der einzelnen Milchsäurebakterienisolate weiter eingegrenzt werden. Als ein Nachteil der angewandten Testmethode wird eine zu geringe Spezifität diskutiert (Galvin et al. 1999, Lewus und Montville 1991). Falsch negative Ergebnisse können durch verminderte Diffusion größerer Substanzen oder Proteinkomplexe durch das Nährmedium entstehen. Weiter können durch die Standardisierung des Verfahrens für eine erfolgreiche Hemmung benötigte erhöhte Konzentrationen oder veränderte Inkubationszeiten nicht berücksichtigt werden.

Ein alternatives Verfahren mit höherer Sensitivität stellt der Agar-Spot-Test dar, welcher von Schillinger und Lucke (1989) und Leite et al. (2015) beschrieben wird. Hier werden Milchsäurebakterien auf einem Nährmedium angezüchtet, mit Chloroform inaktiviert und anschließend mit einem mit Indikatorkeim beimpften Nährmedium überzogen. Bei diesem Testverfahren fehlt allerdings die Möglichkeit die Wirkung eines durch die Bildung organischer Säuren herabgesetzten pH-Wertes auszuschließen. Dasselbe Problem besteht bei der Flip-Streak Methode, bei der, nach Anzucht der Milchsäurebakterien und Drehen des Nährmediums, der Indikatorkeim

aufgetragen wird (Lewus und Montville 1991). Für die Ermittlung einer generellen Hemmfähigkeit der Milchsäurebakterien, sind diese beiden Testverfahren gut geeignet. Mit unseren Untersuchungen sollten jedoch neben der Säurebildung weitere Hemmmechanismen aufgezeigt werden, da bei einer angestrebten Anwendung im Milchdrüsengewebe eine Minderung der Säurewirkung durch präsenzte Puffersysteme zu erwarten ist.

Nach Entfernen der Bakterien und Neutralisierung des pH-Wertes in der Kulturlösung, sind noch 23 % der Isolate in der Lage das Wachstum mindestens eines Indikatororganismus zu hemmen. Weitere Untersuchungen zeigen, dass 23 % dieser Isolate nach Zugabe von Katalase ihre Hemmwirkung einbüßen, was als Hinweis auf eine ursprüngliche Wasserstoffperoxid Wirkung gilt (Collins und Aramaki 1980). Zur weiteren Bestimmung dieses Mechanismus, könnte die Bildung und die gebildete Menge von Wasserstoffperoxid mittels Farbumschlag und -intensität nach Wachstum auf einem mit Tetramethylbenzidin versetzten Nährmedium überprüft werden (Juárez Tomás et al. 2004).

Eine vorhandene Hemmwirkung wird bei 26 % der Isolate durch Zugabe von Pepsin oder Trypsin vermindert. Dies ist vermutlich auf die Spaltung einer proteinartigen Substanz, beispielsweise eines Bakteriozins, durch diese beiden Proteasen zurückzuführen (Karaoğlu et al. 2003). Bei 49 % der Isolate kann keine Minderung der hemmenden Wirkung durch Zugabe dieser drei Substanzen erzielt werden. Dieser relativ hohe Anteil deutet auf eine nicht optimale oder zu eingeschränkte Wahl der Proteasen hin. Das bekannte Bakteriozin Nisin reagiert beispielsweise ebenfalls nicht sensibel auf Pepsin oder Trypsin (Chollet et al. 2008). Basierend auf der These, dass jeder Milchsäurebakterienstamm mindestens ein individuelles Bakteriozin bildet (Klaenhammer 1988), sind auch die Optionen für einzusetzende Proteasen vielfältig. Für eine genaue Identifizierung und Klassifizierung möglicher gebildeter Bakteriozine ist dieses Vorgehen nicht geeignet. Ein PCR gestütztes Verfahren mit geeigneten Primern wird zur Bakteriozinerkennung von Espeche et al. (2012) und Ortolani et al. (2010) aufgeführt. Eine Separation der Bakteriozine durch eine Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) ermöglicht weitere Untersuchungen dieser hemmenden Proteine (McAuliffe et al. 1998, Oh et al. 2000).

6.3 Prüfung probiotischer Eigenschaften

Mikroorganismen, welche als probiotische Bakterien eingesetzt werden sollen, müssen zunächst im Hinblick auf ihre Sicherheit und funktionellen und technologischen Aspekte geprüft werden. Saarela et al. (2000) definieren Kriterien, welche probiotische Bakterienstämme erfüllen sollten. Neben den sicherheitsrelevanten Aspekten wie der Herkunft der Mikroorganismen, Pathogenitätshistorie und antibiotische Resistenz, werden auch funktionelle Ansprüche, wie Überlebensfähigkeit im Zielgewebe, Immunstimulation und antagonistische und antimutagene Fähigkeiten aufgeführt. Obwohl Milchsäurebakterienstämme von der European Food Safety Authority (EFSA) als „Qualified Presumption of Safety (QPS)“ eingestuft werden (EFSA 2007), muss jeder Stamm individuell auf seine Eigenschaften geprüft werden. Dies wird besonders im Hinblick auf taxonomische Einteilungen deutlich. Die Gattungen der Enterokokken und der Streptokokken, unter denen eine Vielzahl pathogener Stämme bekannt sind, gehören taxonomisch zu den Milchsäurebakterien. Die Laktokokken sind eng verwandt mit den Streptokokken, da beide Gattungen zu der Familie der *Streptococaceae* zählen. Vor dem Hintergrund der nahen Verwandtschaft wird deutlich, warum die von Laktokokken gebildeten Bakteriozine eine gute Wirksamkeit gegenüber Streptokokken aufweisen (Parada et al. 2007, Tagg et al. 1976). Neben diesem Vorteil ist allerdings auch das Risiko, von möglichen virulenten Eigenschaften erhöht. Moroni et al. (2015) untersuchten mittels MALDI-TOF-Verfahren aus Mastitismilchproben gewonnene Streptokokken, welche durch die konventionelle Nachweismethode als Äskulin-positive, Koagulase-negative Streptokokken eingestuft wurden. Es zeigte sich, dass 25% der Isolate tatsächlich als *Lactococcus lactis* oder *Lactococcus garviae* (3%) zu identifizieren sind. Die Autoren vermuten, dass die Beteiligung dieser Milchsäurebakterien an infektiösen Vorgängen allgemein unterschätzt wird. Jedoch betonen sie auch, dass die tatsächliche Pathogenität durch einen alleinigen Nachweis in den Milchproben nicht bewiesen ist. Ein weiteres Beispiel für eine Pathogenitätshistorie liefert der in unseren Untersuchungen zur Hemmwirkung genutzte Referenzstamm *Lb. rhamnosus*. Einige Spezies dieses vor allem in der Lebensmittelproduktion eingesetzten Milchsäurebakterienstammes werden seit 2012

der Risikogruppe 2 zugeordnet. Diese Risikogruppe beschreibt „Biostoffe, die eine Krankheit beim Menschen hervorrufen können und eine Gefahr für Beschäftigte darstellen könnten [...]“ (BVL 2013).

Um eine mögliche Pathogenität zu überprüfen, können einige Virulenzfaktoren unter Laborbedingungen untersucht werden. Hierzu zählt die Fähigkeit zur Hämolyseaktivität, Endo- und Exotoxinbildung, Biofilmbildung, oder das Vorkommen von Adhäsinen (Espeche et al. 2012, Hamann 2005).

Als weiterer zu überprüfender negativer Faktor ist die mögliche Existenz von Resistenzeigenschaften zu nennen (FAO und WHO 2001). Sollen probiotische Bakterien in hohen Konzentrationen in einen Wirtsorganismus verbracht werden, kommen sie dort in Kontakt mit den schon vorhandenen autochthonen und allochthonen Mikroorganismen und das Risiko einer möglichen Resistenzübertragung ist erhöht. Milchsäurebakterien verfügen über eine große Anzahl an natürlichen, intrinsischen Resistenzen (Charteris et al. 1998). Vor allem unter den Streptokokken und Enterokokken sind viele Resistenzen bekannt (Espeche et al. 2012). Allerdings sind auch viele *Lactobacillus* Spezies resistent gegen Vancomycin, welches häufig als Indikatorantibiotikum für Resistenzeinschätzungen angegeben wird. Für viele dieser Vancomycin-resistenten Milchsäurebakterien wird allerdings eine lange Geschichte als sichere Probiotika, ohne Nachweis einer Resistenzübertragung aufgeführt (Saarela et al. 2000). Ein besonderes Augenmerk sollte in diesem Zusammenhang auf Plasmid getragene Resistenzgene gelegt werden, welche eine erhöhte Gefahr für die Übertragung durch Konjugation darstellen. In unseren Untersuchungen wurden für weitergehende Studien vorgesehene Milchsäurebakterienisolate mittels PCR-Verfahren auf das Vorhandensein von Resistenzgenen untersucht. Es waren 12 Primerpaare aus 6 Antibiotikagruppen eingeschlossen. Diese Auswahl der Primer gibt zwar einen Einblick in die vorhandene Resistenzsituation, kann aber nicht als vollumfänglich angesehen werden. Ein positiver Resistenzgennachweis führte, unabhängig von der vorhandenen Hemmfähigkeit, zum Ausschluss der Milchsäurebakterienstämme. Die beiden Referenzstämme der stark hemmenden Viererkombination (*Lc. lactis subsp. lactis* ATCC 11454 und *Lb. rhamnosus* ATCC 7469) mussten aus diesem Grund ebenfalls ausgeschlossen werden. Bei einem

möglichen, vermehrten Verbringen lebender Mikroorganismen in andere Ökosysteme sollte demnach eine regelmäßige Kontrolle der Resistenzentwicklung, der Pathogenitätsmerkmale und der antagonistischen Aktivität erfolgen, um sicherheitsrelevante Veränderungen frühzeitig zu identifizieren. Es wird deutlich, welche resistenzbedingten Gefahren ein Einsatz lebender Mikroorganismen als Probiotikum oder Therapeutikum mit sich führen kann (Charteris et al. 1998). Im Umkehrschluss ist auch eine Resistenzentwicklung der Zielerreger gegenüber den Hemmmechanismen der Milchsäurebakterien denkbar, was Einschränkungen in der Wirksamkeit bedeuten würde.

Die Adhäsion der probiotischen Mikroorganismen an Oberflächenzellen des Zielgewebes wird von vielen Autoren als Voraussetzung für eine erfolgreiche Wirkung angesehen (Espeche et al. 2009, Frola et al. 2012b, Saarela et al. 2000). Dies wird mit einer konzentrierteren Wirkung der antimikrobiellen Substanzen und einer erhöhten Konkurrenzsituation gegenüber anderen Bakterien begründet (Otero und Nader-Macías 2007). In einer humanmedizinischen Studie konnte durch die orale Gabe von Milchsäurebakterien die Zahl der an der Darmmukosa anhaftenden *S. aureus* Bakterien um 39 – 44 % reduziert werden (Vesterlund et al. 2006). Allerdings gilt eine Kolonisation an Epithelzellen durch Adhäsine gleichzeitig auch als Pathogenitätsfaktor, durch den Erreger erst ihre pathogene Wirkung hervorrufen können. Vor allem bei rezidivierenden Mastitiden durch Enterokokken oder Staphylokokken werden Adhäsine für eine Persistenz im Gewebe verantwortlich gemacht (Grieger et al. 2014, Hamann 2005). Die Auswirkungen einer Adhäsion kann demnach vielfältig sein. Frola et al. (2012a) berichten beispielsweise von einer histologisch erkennbaren Adhäsion von *Lb. perolens* CRL 1724 an das Drüsengewebe und einer 15 tägigen Nachweisbarkeit in der Milch, wobei der Gehalt somatischer Zellen schon nach 2 Tagen wieder auf den Anfangswert abfällt. Dagegen ermitteln Beecher et al. (2009) eine Nachweisbarkeit für *Lc. lactis* DPC 3147 von 72 h und einen Abfall der somatischen Zellen nach 7 Tagen. Ob sich eine Adhäsion und Kolonisation an die Epithelzellen des Milchdrüsengewebes positiv oder negativ auswirkt, sollte in gesicherten *in-vivo* Untersuchungen individuell geklärt werden.

In unseren Untersuchungen wurde die Adhäsion an bovine Zitzenkanalepithelzellen, welche aus Euter frisch geschlachteter Tiere gewonnen wurden, nach einer von Otero und Nader-Macías (2007) beschriebenen Methode zunächst *in-vitro* untersucht. Die ausgewählten Milchsäurebakterien zeigten eine hohe Adhäsionsfähigkeit an die bovinen Zitzenkanalepithelzellen. Die lichtmikroskopische Auswertung kann aber zu falsch positiven Ergebnissen führen, da nicht entfernte aber auch nicht anhaftende Bakterien fälschlicherweise miterfasst werden. Eine zusätzliche Auswertung mittels Elektronenmikroskop könnte hier genauere Einblicke geben (Frola et al. 2012a). Nachteilig ist außerdem, dass durch dieses Verfahren nur eine Anheftung an Zitzenkanalepithelzellen nachgewiesen wird und die Situation im Drüsengewebe selbst unklar bleibt. Weiterführende histologische Untersuchungen können weitere Befunde im Hinblick auf die Adhäsion aber auch auf die Reaktion der Drüsenzellen darstellen. Frola et al. (2012b) untersuchten das Drüsengewebe nach Infusion von *Lb. perolens* CRL 1724 histologisch. Sie weisen die Mikroorganismen auf der Zelloberfläche der Epithelzellen nach, ohne dass diese morphologisch verändert scheinen.

Ein zu prüfender funktioneller Aspekt ist die Nutzbarkeit der im Zielgewebe vorhandenen Substrate. Milchsäurebakterien stellen komplexe Nährstoffansprüche und ihre hemmenden Eigenschaften beruhen zum Teil auf Nebenprodukten des Kohlenhydratstoffwechsels. Um die Nährstoffbedingungen im Euter nachzustellen, wurde untersucht, ob die isolierten Milchsäurebakterien in der Lage sind sich in kommerzieller UHT-Milch zu vermehren. UHT-Milch zeichnet sich im Vergleich zu Rohmilch durch standardisierte Inhaltsstoffe aus und ist frei von kontaminierenden Keimen. Abweichend von dem im Euter gegebenen Nährstoffvorkommen sind in der UHT-Milch, durch Wärmebehandlung, Homogenisierung und Fettreduzierung, veränderte Enzym-, Vitamin-, und Fettsäuremuster zu erwarten.

Aufgrund der oben genannten Kriterien wurde das Isolat 118/37, welches als *Lb. plantarum* identifiziert wurde, für weiterführende Untersuchungen ausgewählt. *Lb. plantarum* 118/37 ist in der Lage vier Indikatororganismen zu hemmen, ist längerfristig kultivierbar, kann an Euterepithelzellen binden, Milch als Substrat nutzen

und es konnte kein Nachweis für Resistenz kodierende Gene in unserem Testumfang erbracht werden.

6.4 Applikationsmatrix

Für den Einsatz von Probiotika in hohen Konzentrationen, muss eine Applikationsform gefunden werden, welche es ermöglicht, die zu verabreichende Lebendkultur unter konventionellen Kühlvorrichtungen langfristig, stabil und ohne Verlust der hemmenden Eigenschaften zu lagern. Des Weiteren sollte die Konzentration der vitalen Mikroorganismen kontrollierbar sein, um eine Vergleichbarkeit der Versuche zu gewährleisten. In ihrer Arbeit zur Überprüfung der Immunantwort nach Infusion von *Lc. lactis* DPC 3147 betonen Crispie et al. (2008), dass die ausgelöste Immunantwort maßgeblich von der Vitalität der infundierten Organismen abhängt. In unseren Untersuchungen konnten die genannten Anforderungen durch das Verfahren der Gefriertrocknung erfüllt werden.

Um keine zusätzlichen Reaktionen im Eutergewebe auszulösen, wurde ein Gefriertrocknungsprotokoll erarbeitet, welches so wenig Zusätze wie möglich zum Schutz der Mikroorganismen einschließt. Die Gefriertrocknung wurde in einem Medium aus verdünnter Ringerlösung mit zugesetzter Laktose durchgeführt. Laktose hat während des Gefriertrocknungsprozesses und der anschließenden Lagerung einen protektiven Effekt auf Milchsäurebakterien (Otero et al. 2007). Die Bakterien können diesen natürlich im Euter vorkommenden Zucker als Kohlenstoffquelle nutzen. Des weiteren wird Laktose in pharmazeutischen Puderformulierungen verwendet um die Löslichkeit zu erhöhen, was wiederum Vorteile für die Resuspension liefern kann (Otero et al. 2007).

Im Gebrauchsfall können die einzelnen Applikationsdosen durch Zufügen eines Resuspendierungsmediums (verdünnte Ringer-Lösung) schnell reaktiviert und in die bovine Milchdrüse verbracht werden. Die Portionierung in Einzeldosen minimiert das Risiko der Kontamination zum Anwendungszeitpunkt und ermöglicht eine angemessene Lagerung noch nicht verwendeter Applikationsdosen.

6.5 Gewebeverträglichkeit

Da keine vergleichbaren, repräsentativen *in-vitro* Studien zur Verfügung stehen, wurden gesicherte *in-vivo* Versuche geplant, um die Reaktionen des Gewebes nach Inokulation großer Konzentrationen von *Lb. plantarum* 118/37 zu prüfen. Die Literaturrecherche zeigt, dass in vorangegangenen Versuchsansätzen, in denen Milchsäurebakterienspezies in das Eutergewebe verbracht wurden, rapide Immunantworten auftreten, welche bei angemessener Dosierung jedoch keine Störung des Allgemeinbefindens auslösen. So zeigen Frola et al. (2012a), dass bei einer Bakterienkonzentration von 10^6 KbE / ml *Lb. perolens* CRL 1724 keine klinischen Reaktionen am Euter erkennbar sind. Nach Inokulation kommt es lediglich zu einem kurzzeitigen Zellzahlanstieg zwei Tage nach Applikation, welcher bis zum Versuchsende (Tag 14) wieder auf Normalwert abfällt. Bei Beecher et al. (2009) und Crispie et al. (2008) wird durch das Verbringen von *Lc. lactis* DPC 3174 ebenfalls eine rapide, kurzlebige Immunantwort mit erhöhter Genexpression pro-inflammatorischer Gene und Einwanderung von polymorphkernigen Granulozyten und Lymphozyten beobachtet. Da, soweit bekannt, bislang keine Studien vorliegen, welche die Reaktionen nach Verbringen von *Lb. plantarum* in die bovine Milchdrüse beschreiben, wurden für die Gewebeverträglichkeit von *Lb. plantarum* 118/37 drei ältere, laktierende Kühe (> 7. Laktation) ausgewählt. Bei möglicher dauerhafter Schädigung des Eutergewebes, welche durch konservative Therapiemethoden nicht geheilt werden kann, sollte eine Merzung der Tiere angestrebt werden.

Nach Applikation von *Lb. plantarum* 118/37 konnte keine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens oder Schwellungen und Rötungen des Euters festgestellt werden. Bei den Tieren, welche mit der höheren Dosierung behandelt wurden, waren kurzzeitig Flocken sichtbar. Eine durch andere Faktoren ausgelöste Sekretveränderung kann nicht ausgeschlossen werden, da das Vorkommen von Flocken in den Eutervierteln nicht zeitgleich feststellbar war und bei einem Tier beispielsweise erst nach 36 h auftrat. Beecher et al. (2009) berichten, dass bei allen behandelten Tieren 7 h nach Applikation von *Lc. lactis* DPC 3147 neben Flocken im Milchsekret, Schwellungen des Eutergewebes und erhöhte Rektaltemperaturen festgestellt wurden.

In allen Studien, in denen lebende Milchsäurebakterien in das Eutergewebe verbracht werden, wird von einem mehr oder weniger starken Anstieg der somatischen Zellen berichtet (Beecher et al. 2009, Crispie et al. 2008, Frola et al. 2012b, Klostermann et al. 2008, Nagahata et al. 2015). Dieser Zellzahlanstieg wird als Antwort des Immunsystems auf die Gram-positiven Bakterien gedeutet. Nagahata et al. (2015) und Frola et al. (2012b) stellen weiter einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten fest. Auch in unseren zur Orientierung dienenden Untersuchungen konnte ein Anstieg der Zellzahl festgestellt werden, der hauptsächlich auf die Einwanderung neutrophiler Granulozyten zurück zu führen ist. Dass der Zellzahlverlauf bei den drei untersuchten Tieren nicht gleichermaßen stark ansteigt und wieder abfällt, ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Anfangszellgehalte zurückzuführen, die eine schon bestehende immunologische Reaktion anzeigen. Die mit dem Resuspendierungsmedium behandelten Viertel zeigten keine Sekretveränderung und nur einen kurzzeitigen, geringen Zellzahlanstieg.

In der Mastitisdiagnostik gilt ein solcher Anstieg des Zellgehaltes als Zeichen einer stattfindenden Immunreaktion, welche bei Überschreiten eines Grenzwertes als Entzündungsreaktion angesehen wird (DVG 2012). Einige Autoren begründen die durch die lebenden Mikroorganismen induzierte Entzündungsreaktion als gewollte, kontrollierbare Immunreaktion, die dazu beiträgt, neben den Milchsäurebakterien auch pathogene Erreger zu eliminieren (Crispie et al. 2008, Nagahata et al. 2015).

Nun gilt zu definieren, wo die Grenze zwischen gewollter Immunreaktion zur Pathogeneliminierung und beeinträchtigender Entzündungsreaktion für das Tier liegt. Ein möglicher Definitionsansatz wäre die Verwendung der Schweregradeinteilung des internationalen Milchwirtschaftsverbandes (IDF 1999). Leichte Mastitiden (Grad 1), die lediglich mit einer Veränderung des Milchsekretes einhergehen, könnten als „tolerierbar“ eingestuft werden. Werden Veränderungen am Eutergewebe sichtbar oder kommt es sogar zu Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens (Mastitisgrad 2 oder 3) wäre die Grenze zwischen gewollter, therapierender und ungewollter, krankheitserregender Wirkung überschritten. Erwähnenswert ist, dass es auch bei konventioneller Therapie mittels intramammärer antibiotischer Präparate zu Anstiegen der somatischen Zellzahl kommt (Klostermann et al. 2008)

Eine weitere Möglichkeit die Gewebeverträglichkeit zu definieren, wäre eine histologische Untersuchung miteinzuschließen. Nekroseanzeichen der Epithelzellen können hier Hinweise auf unerwünschte Gewebereaktionen liefern (Frola et al. 2012b). Aufgrund der geringen Tierzahl können unsere Untersuchungsergebnisse nur als Hinweise gewertet werden. Allerdings sprechen die oben aufgeführten Argumente dafür, dass das Verbringen von *Lb. plantarum* 118/37 in den beschriebenen Konzentrationen in die bovine Milchdrüse als verträglich anzusehen ist.

6.6 Dosisfindung

Nach diesen ersten Erkenntnissen sollte für die Weiterentwicklung eines möglichen Therapeutikums ein Versuch zur Bestimmung einer zu wählenden Dosierung der lebenden Mikroorganismen durchgeführt werden. Hinweise aus der Literatur und die Erkenntnisse aus dem vorangegangenen Gewebeverträglichkeitsversuch wurden zur Orientierung für die gewählten Dosierungen verwendet. Frola et al. (2012a) bestimmte 10^6 KbE / ml als höchste Konzentration von *Lb. perolens* CRL 1724, welche keine langfristigen Entzündungszeichen am Eutergewebe oder Sekretveränderungen verursachte. Von Crispie et al. (2008) wird die Konzentration von 10^3 KbE / ml von *Lc. lactis* 3147 als Mindestdosierung angegeben, um überhaupt eine angemessene Immunreaktion auszulösen. Demnach wurden drei verschiedene Dosierungen ($1,01 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$ und $3,0 \times 10^6$ KbE / ml) von *Lb. plantarum* 118/37 ausgewählt, um die Gewebe- und Immunantwort an drei klinisch eutergesunden Tieren zu testen.

Unabhängig von der durchgeführten Behandlung konnte ein signifikanter Zellanzug 12 h nach Applikation des Milchsäurebakterienstammes in jedem Euterviertel festgestellt werden. In den Eutervierteln, welche mit der höchsten Dosierung ($3,0 \times 10^6$ KbE / ml) behandelt wurden, war dieser Anstieg am stärksten, fiel aber auch am schnellsten wieder ab. Die einwandernden Zellen waren hauptsächlich Phagozyten (polymorphkernige, neutrophile Granulozyten). Wie in Kapitel 6.5 schon erläutert, wird der Anstieg der somatischen Zellen nach Applikation von *Lactococcus* oder *Lactobacillus* Spezies auch von anderen Autoren beschrieben (Beecher et al. 2009, Crispie et al. 2008, Frola et al. 2012b, Klostermann et al. 2008, Nagahata et al.

2015). Dieser Zellzahlenanstieg, der gleichzeitig eine Antwort des Immunsystems auf die eingeführten Bakterien darstellt, wurde von einigen Autoren weiter untersucht.

Nagahata et al. (2015) und Beecher et al. (2009) weisen eine vermehrte Expression pro-inflammatorischer Gene wie *IL-1 β* , *IL-8*, *IL-10*, *TNF- α* nach. Dieser Anstieg konnte schon 7 h nach Applikation von *Lc. lactis* DPC 3147 festgestellt werden und nahm nach 72 h wieder ab, zu dem Zeitpunkt als auch keine Milchsäurebakterien mehr nachweisbar waren (Beecher et al. 2009). Diese Expression fällt, im Vergleich mit der von Euterpathogenen (*S. aureus*, *Sc. dysagalactiae*, *E. coli*) ausgelösten Immunreaktion, höher aus. Daraus schließen die Autoren, dass die für eine erfolgreiche Immunabwehr benötigte Hochregulierung der Cytokine und Chemokine, effektiver durch die applizierten Milchsäurebakterien ausgelöst werden kann. Weiter könnte dieser ausgelöste Abwehrmechanismus, neben der Beseitigung der eingeführten Milchsäurebakterien, für eine Elimination anderer unerwünschter Organismen genutzt werden (Rainard und Riollet 2006). Dies könnte vor allem bei Pathogenen einen Vorteil bieten, die sich durch intrazelluläres Überdauern in Granulozyten oder Epithelzellen, wie beispielsweise *S. aureus*, dem Immunsystem entziehen (Petzl et al. 2008). Crispie et al. (2008) berichten ebenfalls von einem deutlichen Anstieg polymorphkerniger Granulozyten und Lymphozyten nach Applikation von *Lc. lactis* DPC 3147 mit zusätzlich signifikanter Erhöhung von Akute-Phase-Proteinen. Eine erhöhte Chemiluminiszenz deutet weiter auf aktive polymorphkernige Granulozyten hin (Nagahata et al. 2015). Erkenntnisse aus der Humanmedizin zeigen, dass durch die orale Impfung mit *Lactobacillus* Stämmen, vor allem *Lb. plantarum*, das Immunsystem auch von immungeschwächten Patienten gezielt angeregt werden kann (Cross 2002, Foligne et al. 2007, Seegers 2002).

Diese Ergebnisse stützen die These, dass mittels Inokulation der Gram-positiven Mikroorganismen eine rapide Immunstimulation ausgelöst werden kann, welche neben der Reduktion der Milchsäurebakterien auch Auswirkungen auf pathogene Mikroorganismen hat, die sich sonst einer solchen Immunantwort entzogen hätten (Hertl et al. 2010, Mehrzad et al. 2010, Schukken et al. 1997).

12 h nach Applikation von $3,0 \times 10^6$ KbE / ml wurden in zwei Eutervierteln Flocken festgestellt, welche 24 h nach Applikation nicht mehr zu finden waren. Die niedrigeren

Dosierungen verursachten keine Sekretveränderungen, allerdings war die Immunantwort hier verzögert. Während bei der Dosierung von $3,0 \times 10^6$ KbE / ml der Zellzahlhöhepunkt nach 12 h und die Rückkehr zum Anfangszellgehalt nach 24 h – 36 h erreicht wurde, war diese Reaktion bei den niedrigeren Dosierungen um 12 bis 24 h verschoben.

Bei den unbehandelten Kontrollvierteln kam es auch zu einem, allerdings sehr geringen, synchronen Zellzahlanstieg. Dies ist zum einen durch viertelübergreifende Reaktionen zu erklären (Crispie et al. 2008), zum anderen können aber auch Kontaminationen nicht ausgeschlossen werden, da in der Milchprobe eines Kontrollviertels *Lb. plantarum* 118/38 nachgewiesen werden konnte.

Die durchschnittliche Zellzahl der untersuchten Euterviertel war am Ende des Versuches (Tag 6) geringer, als zu Beginn. Lediglich ein Viertel bildet hier eine Ausnahme, da ein plötzlicher Zellzahlanstieg an Tag 6 erfolgte, welcher möglicherweise auf eine Neuinfektion zurückzuführen ist.

Das relativ schnelle Absinken der Zellgehalte lässt vermuten, dass der infundierte Milchsäurebakterienstamm schnell von den Immunzellen eliminiert wird und sich nicht in den behandelten Vierteln etablieren kann. Dies bestätigt auch die RAPD-PCR Methode. Aus den Milchproben gewonnene Isolate, welche phänotypisch den Milchsäurebakterien zugeordnet werden konnten, wurden mittels RAPD-PCR mit *Lb. plantarum* 118/37 verglichen und somit identifiziert. *Lb. plantarum* 118/37 konnte nicht länger als 36 h im Sekret behandelter Viertel nachgewiesen werden. In anderen Untersuchungen werden Zeiträume von 72 h oder 15 Tagen angegeben (Beecher et al. 2009, Frola et al. 2012a). Die Nachweise erfolgten hier allerdings nur auf Grundlage einer phänotypischen Erkennung nach kultureller Anzucht.

Mit der Annahme, dass die Milchsäurebakterien relativ schnell wieder aus dem Euter verdrängt werden, stellt sich die Frage, ob ihre antimikrobiellen Fähigkeiten Einfluss auf andere Organismen haben können. Die Verdrängung könnte durch mehrmalige Gaben der Bakterien ausgeglichen werden. Jedoch ist neben der Ermittlung eines optimalen Behandlungsintervalls die Reaktion des Immunsystems und des Gewebes nach Mehrfachapplikation zu testen.

Diese ersten Untersuchungen können als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen und bestätigen die Annahme, dass die Applikation von *Lb. plantarum* 118/37 in die bovine Milchdrüse eine Immunantwort stimuliert, welche möglicherweise zu einer Elimination von Euterpathogenen beitragen kann.

Klostermann et al. (2008) testeten die therapeutische Wirkung von *Lc. lactis* DPC3147 im Vergleich zu einer konventionellen Antibiotikatherapie. In den zwei beschriebenen Teilversuchen, in welche subklinisch und klinisch erkrankte Milchdrüsenviertel einbezogen wurden, waren die klinische und bakteriologische Heilungsrate mit der einer antibiotischen Therapie vergleichbar (als pathogen-frei galten Proben mit <500 KbE / ml des zuvor gefundenen Erregers). In einer anderen Studie wurde die bakteriologische Heilungsrate und die Immunantwort durch eine Behandlung mit *Bifidobacterium breve* (3 ml, 3×10^9 cfu / ml) bestimmt (Nagahata et al. 2015). Die Heilungsraten liegen in diesen Untersuchungen je nach Erreger zwischen 20% bis 62%.

Um solche Wirksamkeitsuntersuchungen mit dem hier vorgestellten Milchsäurebakterienstamm *Lb. plantarum* 118/37 durchzuführen, muss zunächst ein optimales Applikationsintervall und eine ausreichende Behandlungsdauer definiert werden. Bei der, aufgrund der kurzlebigen, starken Immunantwort ohne Miteinbeziehung des Allgemeinbefindens der Versuchstiere, zu empfehlenden Dosierung von $3,0 \times 10^6$ KbE / ml, sollte das Applikationsintervall 12 h betragen, da es nach diesem Zeitraum wieder zu einem Abklingen der Immunreaktion kommt.

In einem nächsten Entwicklungsschritt muss mit statistisch auswertbarer Tierzahl die Wirksamkeit dieses Therapeutikums auf Basis lebender Mikroorganismen zur Behandlung klinischer Mastitiden im Vergleich zu einer konventionellen antibiotischen Therapie getestet werden. Interessant ist hierbei nicht nur, ob die erhöhte Anzahl inflammatorischer Substanzen positive Auswirkungen auf eine Pathogenelimination hat, sondern inwieweit eine Immunsystemaktivierung bei Eutervierteln mit bereits erhöhter Zellzahl möglich und effektiv ist.

Gelingt es, eine effektive Behandlungsmöglichkeit boviner Mastitiden auf Basis einer Lebendkultur zu etablieren, könnte dies, neben der generellen Einsparung antibiotischer Präparate, auch die hemmstoffbedingten Milchverluste reduzieren. Die

eingesetzten Milchsäurebakterien gelten, neben den in 6.3 beschriebenen Einschränkungen, weitgehend als sicher und werden gegenwärtig zur Herstellung von Käse, Joghurt und Wurst in der Lebensmittelproduktion eingesetzt. Bakterienrückstände in der Milch dürften auch aufgrund von Pasteurisierungsprozessen bei der Milchverarbeitung keine nachteiligen Einflüsse auf den Konsumenten haben. Die lebensmitteltechnischen Auswirkungen für die Weiterverarbeitung von Rohmilchprodukten bei unsachgemäßer Kühlung, Lagerung oder Thermisierung in Form von ungewollter Gerinnung oder Blähprozessen sind allerdings noch zu untersuchen.

7 Zusammenfassung

Ann-Christin Diepers

Isolierung von Milchsäurebakterien mit hemmender Wirkung gegenüber Euterpathogenen und orientierende Untersuchungen zur intramammären Anwendung an der bovinen Milchdrüse

Die bovine Mastitis, eine der einflussreichsten Erkrankungen der Milchkuh, liefert den häufigsten Grund für eine Therapie mittels antibiotischer Präparate. Um den Einsatz von Antibiotika in der Milchproduktion zu reduzieren, müssen alternative, nachhaltige Therapiemethoden gefunden werden. Milchsäurebakterien haben wachstumshemmende Eigenschaften gegenüber anderen Mikroorganismen und werden größtenteils als sichere, probiotische Bakterien eingestuft.

Ziel dieser Arbeit war es, Milchsäurebakterien aufgrund ihrer antagonistischen und probiotischen Fähigkeiten auszuwählen, um zur Entwicklung eines alternativen Therapeutikums zur Behandlung boviner Mastitiden beizutragen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden hierfür Milchsäurebakterien aus Milch-, Gras-, Gülle- und Einstreuproben aus dem bovinen Umfeld isoliert und auf ihre antagonistischen Fähigkeiten und probiotischen Eigenschaften untersucht. Die gewonnenen Isolate und Kombinationen mit Referenzstämmen wurden mittels Well-Diffusions-Test auf ihre wachstumshemmenden Fähigkeiten gegenüber sechs ausgewählten Euterpathogenen (*Staphylococcus (S.) aureus* ATCC 12600, *S. epidermidis* 575/07, *S. xylosus* 35/07, *Streptococcus (Sc.) agalactiae* ATCC 27956, *Sc. uberis* ATCC 700407, *Escherichia (E.) coli* DSM 4230) untersucht. Die Hälfte der untersuchten Milchsäurebakterienisolate konnte das Wachstum mindestens eines Indikatorkeims hemmen. Nach Neutralisierung des niedrigen pH-Wertes, der einen der Hauptthemmechanismen darstellt, waren noch ungefähr ein Viertel dieser Isolate in der Lage wachstumshemmend einzuwirken. *Sc. uberis* wurde am häufigsten gehemmt, gefolgt von *S. epidermidis*, *S. aureus* und *S. xylosus*. Nur eine

Viererkombination aus zwei Wildstämmen (*Lactobacillus (Lb.) plantarum* 118/37 und *Lb. paracasei* 78/37) und zwei Referenzstämmen (*Lactococcus (Lc.) lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 und *Lb. rhamnosus* ATCC7469) war in der Lage alle sechs Indikatorkeime in ihrem Wachstum zu hemmen. Bei hemmenden Milchsäurebakterienisolaten wurde eine biochemische und molekularbiologische Speziesbestimmung durchgeführt und ihre Resistenzeigenschaften geprüft. Zusätzlich wurde untersucht, ob sie im Hinblick auf eine Anwendung am Euter in der Lage sind an Zitzenkanalepithelzellen anzuheften und Milch als Substrat zu nutzen. Nach Einbeziehung aller funktionellen, technischen und sicherheitsrelevanten Kriterien wurde der Milchsäurebakterienstamm *Lb. plantarum* 118/37 für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde, mit dem Ziel eine Applikationsform auf Basis lebender Mikroorganismen zu entwickeln, ein Gefriertrocknungsverfahren etabliert, welches eine stabile, langfristige Lagerung von *Lb. plantarum* 118/37 bei gleichzeitiger schneller Reaktivierungsmöglichkeit im Behandlungsfall ermöglicht. In anfänglichen Untersuchungen zur Gewebeverträglichkeit wurden 10 ml dieser Mikroorganismensuspension in den Konzentrationen 10^4 und 10^6 KbE (Kolonie-bildende Einheiten) / ml in die bovine Milchdrüse verbracht. Keine Störungen des Allgemeinbefindens oder sichtbaren Beeinträchtigungen des Eutergewebes konnten festgestellt werden. Ein moderater Anstieg der somatischen Zellzahl in der Milch konnte in allen Eutervierteln ermittelt werden. Bei einer Dosierung von 10^6 KbE / ml kam es zu einer kurzzeitigen Sekretveränderung in Form von Flockenbildung. *Lb. plantarum* 118/37 konnte bis zu 36 h nach Applikation aus Milchproben isoliert und mittels RAPD-PCR im Milchsekret nachgewiesen werden.

Erste Untersuchungen zur Dosisdefinition wurden an drei weiteren, klinisch eutergesunden Kühen durchgeführt. Die gewählten Dosierungen waren $1,01 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$ und $3,0 \times 10^6$ KbE / ml *Lb. plantarum* 118/37. Unabhängig von der infundierten Menge der Milchsäurebakterien, waren keine Störungen des Allgemeinbefindens oder sichtbare Veränderungen des Eutergewebes feststellbar. Flockenbildung im Milchsekret wurde kurzzeitig bei der höchsten Dosierung in zwei Vierteln festgestellt. Die Behandlung mit der Lebendkultur verursachte in allen Vierteln

einen signifikanten Zellzahlanstieg 12 h nach Applikation. Den schnellsten und kurzlebigsten Anstieg mit einem Höhepunkt nach 12 h war nach Applikation von $3,0 \times 10^6$ KbE / ml zu beobachten. Die Zellzahl stieg in allen Vierteln nach 1-3 Tagen wieder ab und war durchschnittlich geringer als am Anfang des Versuches. Dem Zellzahlanstieg lag eine Rekrutierung phagozytotischer Zellen zugrunde, vor allem polymorphkerniger, neutrophiler Granulozyten. Für eine Etablierung in der Milchdrüse gibt es keine Hinweise, da *Lb. plantarum* 118/37 unabhängig von der angewandten Dosierung nicht länger als 36 h im Milchsekret identifizierbar war.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit liefern wichtige Informationen über die noch ungenutzten Fähigkeiten probiotischer Bakterien für die Anwendung in der bovinen Milchdrüse. Weitere Untersuchungen sind nötig, um optimale Behandlungsschemata festzulegen und die Wirksamkeit dieser Therapiemethode bei klinischen Mastitiden zu überprüfen. Nichtsdestotrotz werden wichtige Ansatzpunkte für eine alternative, nachhaltige Therapie boviner Mastitiden unter Sicherstellung von Tier- und Verbraucherschutz und eine Verminderung des Antibiotikaeinsatzes in der Milcherzeugung aufgezeigt.

8 Summary

Ann-Christin Diepers

Isolation of lactic acid bacteria with the ability to inhibit mastitis-causing pathogens and preliminary assessment of administration into the bovine mammary gland

Bovine mastitis is one of the most influential infectious diseases of dairy cows and therefore one of the main reasons for antibiotic treatment in dairy industry. To reduce the use of antibiotics in milk production, alternative, sustainable treatment methods have to be sought. Lactic acid bacteria (LAB) show inhibiting activities against other microorganisms, are generally recognized as safe and may have curative capabilities. The aim of this thesis was to isolate and select LAB strains according to their antagonistic and probiotic abilities and to develop a live culture treatment.

In a first investigation, LAB were isolated out of bovine environment (quarter foremilk samples, bulk milk, grass, manure and bedding materials). The obtained wild isolates and combinations with reference strains were screened with agar well diffusion assay for their ability to inhibit the growth of six indicator pathogens (*Staphylococcus* (*S.*) *aureus* ATCC 12600, *S. epidermidis* 575/07, *S. xylosus* 35/07, *Streptococcus* (*Sc.*) *agalactiae* ATCC 27956, *Sc. uberis* ATCC 700407, *Escherichia* (*E.*) *coli* DSM 4230). More than half of these wild isolates were able to inhibit at least one indicator pathogen. After neutralization of the low pH-value, which presents one of the main inhibiting mechanisms of LAB, nearly one quarter of these isolates were still able to act growth retarding. *Sc. uberis* was the most inhibited indicator strain, followed by *S. epidermidis*, *S. aureus* and *S. xylosus*. Only the combination of two wild strains (*Lactobacillus* (*Lb.*) *plantarum* 118/37 und *Lb. paracasei* 78/37) and two reference strains (*Lactococcus*

(*Lc.*) *lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 und *Lb. rhamnosus* ATCC7469) inhibited all six pathogens. For further species determination, isolates with inhibiting properties were examined with biochemical and genetic identification assays and the presence of genes, related to antibiotic resistance was tested. Additionally, their adhesion capacity to bovine teat canal epithelial cells and their ability to use milk as a substrate were determined. Taking these functional, technical and security-related criteria into account, the long-term cultivable strain *Lb. plantarum* 118/37 was chosen for further investigations.

With the aim of developing a treatment based on a live culture, a freeze-drying protocol was established, which enables a durable storage with a quick reactivation possibility if treatment is required. A first assessment was conducted to evaluate tissue tolerability and immune response after an intramammary infusion of 10 mL *Lb. plantarum* 118/37 at a concentration of 10^4 and 10^6 cfu (colony forming units) / mL. No disturbance of general condition or visible impairment of udder tissue were detected. A slight increase in somatic cell count (SCC) were found in every treated quarter. The quarters treated with 10^6 cfu / mL show a temporary alteration of milk appearance.

For dose determination three doses of *Lb. plantarum* 118/37 (1.01×10^6 , 2.0×10^6 and 3.0×10^6 cfu / mL) were inoculated into the mammary gland of three clinically healthy cows, one quarter was left as control. Independent of the infused LAB concentration, no signs of tissue disturbance or impairment of general condition were detected. Two quarters, which were treated with the highest LAB concentration, temporarily showed clots 12 h post infusion, which were disappeared by the next sampling. Infusion with a live culture leads to a rapid and considerable innate immune response. There was a significant increase in somatic cell count 12 h post infusion in every quarter regardless of treatment. The most rapid and short-lived increase, with its peak after 12 h, was observed after application of 3.0×10^6 cfu / mL. The SCC decreased after 1 – 3 days in every treated quarter and the average SCC was lower than at the beginning of the trial. The infusion of the live culture effects a recruitment of phagocytic cells, particularly neutrophils and macrophages. In the subsequent taken milk samples *Lb. plantarum* 118/37 was isolated and identified with RAPD-PCR method but was no longer detectable in any of the treated udder quarters after 36 h.

The findings of this study deliver important information about the unused abilities of probiotic bacteria and their possible application into the bovine mammary gland. Further investigations are necessary to determine an optimal treatment scheme and proof the efficacy of this treatment method for clinical mastitis cases. Nevertheless, the results of this investigation provide important starting points for an alternative, sustainable therapy of bovine mastitis under the aspects of animal welfare and consumer protection and a reduction of the antibiotic use in milk production.

9 Literaturverzeichnis

- Alluwaimi, A.M. (2004): The cytokines of bovine mammary gland: Prospects for diagnosis and therapy. *Res. Vet. Sci.* 77, 211–222
- Anas, M., Eddine, H.J., Mebrouk, K. (2008): Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat' s milk against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy Food Sci.* 3, 39–49
- Arroyo, R., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Fernández, L., Rodríguez, J.M. (2010): Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of *Lactobacilli* isolated from breast milk. *Clin. Infect. Dis.* 50, 1551–1558
- Barefoot, S.F., Nettles, C.G. (1993): Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures. *J. Dairy Sci.* 76, 2366–2379
- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Zadoks, R.N. (2006): Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 89, 1877–1895
- Beecher, C., Daly, M., Berry, D.P., Klostermann, K., Flynn, J., Meaney, W., Hill, C., McCarthy, T. V, Ross, R.P., Giblin, L. (2009): Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1beta and IL-8 gene expression. *J. Dairy Res.* 76, 340–348
- Benkerroum, N., Sandine, W.E. (1988): Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.* 71, 3237–3245
- Beasley, S. (2004): Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. Helsinki, Helsingin yliopisto, Inst. för elintarvike ja ympäristötieteiden laitos, Osasto soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos, Diss.
- Björkroth, J., Dicks, L.M.T., Endo, A., Holzapfel, W.H. (2014): The genus *Leuconostoc*, in: *Lactic Acid Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, S. 391–404

- BMEL (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft) (2016): Produktionswert tierischer Erzeugnisse in der Landwirtschaft in Deutschland nach Bereichen in den Jahren 2007 bis 2014 (in Millionen Euro).
<https://de.statista.com/statistik/daten/studie/75625/umfrage/produktionswert-tierischer-erzeugnisse-zu-erzeugerpreisen/> (Zugriff: 25.07.2017)
- BMEL, (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft) (2015): Milcherzeugung, Milchleistung und Milchlieferung.
https://www.bmel-statistik.de//fileadmin/user_upload/monatsberichte/SJB-0002015-2015.pdf, S.157 (Zugriff: 25.07.2017)
- Bradley, A.J. (2002): Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet. J.* 164, 116–128
- Broadbent, J.R., Chou, Y.C., Gillies, K., Kondo, J.K. (1989) Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. *J. Dairy Sci.* 72, 3342–3345
- BVL, (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittel) (2014): Die 16. AMG Novelle
http://www.bvl.bund.de/DE/05_Tierarzneimittel/05_Fachmeldungen/2014/2014_02_06_Fa_Arzneimittelgesetz.html?nn=1644492 (Zugriff: 24.07.2017)
- BVL, (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittel) (2013): Datenbank zu sicherheitsbewerteten Organismen
<http://apps2.bvl.bund.de/organismen/organisms.jsf> (Zugriff:09.08.2017)
- Cao, L.T., Wu, J.Q., Xie, F., Hu, S.H., Mo, Y. (2007): Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 3980–3985
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. (2002): The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 281–370
- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P. (2004): Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 14, 835–847
- Cha, E., Bar, D., Hertl, J. A, Tauer, L.W., Bennett, G., González, R.N., Schukken, Y.H., Welcome, F.L., Gröhn, Y.T. (2011): The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming. *J. Dairy Sci.* 94, 4476–4487

- Chaimanee, V., Sakulsingharoj, C., Deejing, S., Seetakoses, P., Niamsup, P. (2009): Screening and characterization of bacteriocin-producing bacteria capable of inhibiting the growth of bovine mastitis. *Maejo Int. J. Sci. Technol.* 3, 43–52
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. (1998): Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. *J. Food Prot.* 6, 636–643
- Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A., Degraeve, P. (2008): Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control* 19, 982–989
- Christ, K. (2007): Simulation der antimikrobiellen Wirkung ausgewählter Lantibiotika mittels kombinierter Biosensortechnik. Bonn, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Univ. Math.-Nat. Fak., Diss.
- Clark, N.C., Olsvik, Ø., Swenson, J.M., Carol, A., Tenover, F.C., Spiegel, C. a (1999): Detection of a streptomycin / spectinomycin adenylyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 157–160.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P.R. (2005): Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 777–788
- Crispie, F., Alonso-Gómez, M., O'Loughlin, C., Klostermann, K., Flynn, J., Arkins, S., Meaney, W., Ross, R.P., Hill, C. (2008): Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live *lactococci* on the mammary immune response. *J. Dairy Res.* 75, 374–384
- Cross, M.L. (2002): Microbes versus microbes: Immune signals generated by probiotic *lactobacilli* and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34, 245–253
- Daley, M., Williams, T., Coyle, P., Furda, G., Dougherty, R., Hayes, P. (1993): Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* infections with recombinant cytokines. *Cytokine* 5, 276–284
- Deluyker, H.A., Van Oye, S.N., Boucher, J.F. (2005): Factors affecting cure and somatic cell count after Pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 88, 604–614

- Diarra, M.S., Petitclerc, D., Deschênes, É., Lessard, N., Grondin, G., Talbot, B.G., Lacasse, P. (2003): Lactoferrin against *Staphylococcus aureus* mastitis: Lactoferrin alone or in combination with penicillin G on bovine polymorphonuclear function and mammary epithelial cells colonisation by *Staphylococcus aureus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 95, 33–42
- Diepers, A.-C., Krömker, V., Zinke, C., Wente, N., Pan, L., Paulsen, K., Paduch, J.-H. (2016): *In-vitro* ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens. *Sustain. Chem. Pharm.* 0–1
- Djabri, B., Bareille, N., Beaudou, F., Seegers, H. (2002): Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: A meta-analysis. *Vet. Res.* 33, 335–357
- Douillard, F.P., de Vos, W.M. (2014): Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microb. Cell Fact.* 13, 1-21
- DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.) (2012) Leitlinien Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. 5. Auflage. Verlag der DVG e.V., Gießen.
- DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.) (2009) Leitlinien Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung von Mastitiserregern. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen. 2. Auflage. Verlag der DVG e.V., Gießen.
- EFSA (European Food and Safety Authority) (2007): Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA Journal* 587, 1-16
- EMA (European Medicines Agency) (2016): Guideline on the conduct of efficacy studies for intramammary products for use in cattle. EMA, London
- Erkkilä, S. (2001): Bioprotective and probiotic meat starter cultures for the fermentation of dry sausages. Helsinki, Helsingin yliopisto, Inst. för livsmedels- och miljövetenskaper, Diss.
- Espeche, M.C., Otero, M.C., Sesma, F., Nader-Macias, M.E.F. (2009): Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Vet. Microbiol.* 135, 346–357

- Espeche, M.C., Pellegrino, M., Frola, I., Larriestra, A., Bogni, C., Nader-Macías, M.E.F. (2012): Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe* 18, 103–109
- FAO / WHO (Food and Agriculture Organization / World Health Organization of the united nations) (2006): Probiotics in food; Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, Food and Nutrition Paper. 85, Rome
- FAO / WHO (Food and Agriculture Organization / World Health Organization of the united nations) (2001): Health and nutritional properties of Probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba
- Fernández, L., Delgado, S., Herrero, H., Maldonado, A., Rodríguez, J.M. (2008): The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. *J. Hum. Lact.* 24, 311–316
- Foligne, B., Nutten, S., Granette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A., Pot, B. (2007): Correlation between *in-vitro* and *in-vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J. Gastroenterol.* 13, 236–243
- Franz, C.M.A.P., Endo, A., Abriouel, H., Reenen, C.A. Van, Gálvez, A., Dicks, L.M.T. (2014): The genus *Pediococcus*, in: *Lactic Acid Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, S. 359–376
- Frola, I.D., Pellegrino, M.S., Espeche, M.C., Giraudo, J. a, Nader-Macias, M.E., Bogni, C.I. (2012a): Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders. *J. Dairy Res.* 79, 84–92
- Frola, I.D., Pellegrino, M.S., Magnano, G., Giraudo, J. a, Espeche, M.C., Nader-Macias, M.E., Bogni, C.I. (2012b): Histological examination of non-lactating bovine udders inoculated with *Lactobacillus perolens* CRL 1724. *J. Dairy Res.* 1–8
- Galvin, M., Hill, C., Ross, R.P. (1999): Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 355–358

- Gill, J.J., Sabour, P.M., Gong, J., Yu, H., Leslie, K., Griffiths, M.W. (2006): Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 471–481
- Gillespie, B.E., Jayarao, B.M., Oliver, S.P. (1997): Identification of *Streptococcus species* by randomly amplified polymorphic deoxyribonucleic acid fingerprinting. *J. Dairy Sci.* 80, 471–476
- Gillor, O., Etzion, A., Riley, M.A. (2009): The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol.* 81, 591–606
- Greene, W.A., Gano, A.M., Smith, K.L., Hogan, J.S., Todhunter, D.A. (1991): Comparison of probiotic and antibiotic intramammary therapy of cattle with elevated somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 74, 2976–2981
- Grieger, A., Paduch, J., Hoedemaker, M., Krömker, V. (2014): Rezidivierende klinische Mastitiden bei Milchkühen – Bedeutung und Ursachen. *Tierärztliche Prax. Großtiere* 156–162
- Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., Kaltsatos, V. (2001): Bovine mastitis and intramammary drug delivery: Review and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50, 245–259
- Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., Hogeveen, H. (2007): Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet. Q.* 29, 18–31
- Hamann, J. (2005): Diagnosis of Mastitis and Indicators of Milk Quality, in: Proceedings of 4th IDF International Dairy Conference: Mastitis in dairy production - current knowledge and future solutions. Wageningen 2005, Kongr.ber., S. 82–90.
- Harmon, R.J. (1994): Physiology of mastitis and factors affecting cell counts. *J. Dairy Sci.* 77, 2103–2112.
- Hertl, J. a, Gröhn, Y.T., Leach, J.D.G., Bar, D., Bennett, G.J., González, R.N., Rauch, B.J., Welcome, F.L., Tauer, L.W., Schukken, Y.H. (2010): Effects of clinical mastitis caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 1551–1560
- Hill, C. (2010): Probiotics and pharmabiotics: Alternative medicine or an evidence-based alternative? *Bioeng. Bugs* 2, 79–84

- Hillerton, J.E., Kliem, K.E., 2002. Effective treatment of *Streptococcus uberis* clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. J. Dairy Sci. 85, 1009–1014
- Holzappel, W.H., Wood, B.J. (2014): Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, S. 1-7, 13-17, 45-47, 50-51
- IDF (International Dairy Federation) (2011): Suggested interpretation of mastitis terminology. Bulletin of the International Dairy Federation. 448, 1-35
- IDF (International Dairy Federation) (2005): Economic consequences of mastitis. Bulletin of the International Dairy Federation. No 394, 2–25
- IDF (International Dairy Federation) (1999): Suggested interpretation of mastitis terminology. Bulletin of the International Dairy Federation. 338, 7
- IDF (International Dairy Federation) (1987): Definition and guidelines for diagnosis. Bulletin of the International Dairy Federation. 211, 3-24
- Juárez Tomás, M.S., Otero, M.C., Ocaña, V., Nader-Macías, M.E. (2004): Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria I: determination of hydrogen peroxide. In Public Health Microbiology: Methods and Protocols. 337–346.
- Karaoğlu, Ş., A., Aydın, F., Kiliç, S.S., Kiliç, A.O. (2003): Antimicrobial activity and characteristics of Bacteriocins produced by vaginal *Lactobacilli*. Turkish J. Med. Sci. 33, 7–13
- Kauf, A.C.W., Vinyard, B.T., Bannerman, D.D. (2007): Effect of intramammary infusion of bacterial lipopolysaccharide on experimentally induced *Staphylococcus aureus* intramammary infection. Res. Vet. Sci. 82, 39–46
- Kehrli, M.E., Shuster, D.E. (1994): Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. J. Dairy Sci. 77, 619–27
- Klaenhammer, T.R. (1993): Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12, 39–85
- Klaenhammer, T.R. (1988): Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70, 337–349
- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Meaney, W.J., Paul Ross, R., Hill, C. (2010): Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lacticin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. J. Dairy Res. 77, 231–238

- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R.P., Hill, C., Meaney, W. (2008): Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *J. Dairy Res.* 75, 365–373
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2006): Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* 16, 945-960
- Krömker (2007): Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Enke Verlag, Stuttgart, S. 48-49, 50, 51, 58-60, 60
- Krömker, V. (2009): Risikoorientierte Mastitisbekämpfung; Flaschenhalsanalyse zur Verhinderung von Neuinfektionen. *Nutztierpraxis Aktuell* 14–17
- Krömker, V., Friedrich, J. (2011): Empfehlungen zum diagnostischen Aufwand im Rahmen der Mastitisbekämpfung auf Bestandsebene. *Prakt. Tierarzt* 92, 516–524
- Kwon, H.S., Yang, E.H., Yeon, S.W., Kang, B.H., Kim, T.Y. (2004): Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 239, 267–275
- Laevens, H., Deluyker, H., Schukken, Y.H., De Meulemeester, L., Vandermeersch, R., De Muêlenaere, E., De Kruif, A. (1997): Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80, 3219–3226
- Lam, T.J.G.M., van den Borne, B.H.P., Jansen, J., Huijps, K., van Veersen, J.C.L., van Schaik, G., Hogeveen, H. (2013): Improving bovine udder health: a national mastitis control program in the Netherlands. *J. Dairy Sci.* 96, 1301–1311
- Le Marc, Y., Valík, L., Medved'ová, A. (2009): Modelling the effect of the starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 306–311
- Leite, A.M.O., Miguel, M. a. L., Peixoto, R.S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V.M.F., Mayo, B., Delgado, S. (2015): Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *J. Dairy Sci.* 98, 3622–3632
- Leitner, G., Lubashevsky, E., Trainin, Z. (2003): *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows, composition and evaluation of its immunogenicity in a mouse model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 93, 159–167

- Lewus, C.B., Montville, T.J. (1991): Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods* 13, 145–150
- Linder, M., Paduch, J.-H., Krömker, V. (2013): Heilungsraten chronischer subklinischer *Staphylococcus aureus*-Mastitiden nach antibiotischer Therapie bei laktierenden Milchkühen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 126, 10–15
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.-H., Díaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D. (2006): Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15611–15616
- Mansion-de Vries, E.M. (2016): Entwicklung und Bewertung eines evidenzbasierten Mastitistherapiekonzeptes auf der Basis direkter haustierärztlicher Schnelldiagnostik mit dem Ziel der Antibiotikareduktion. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Mansion-de Vries, E.M., Knorr, N., Paduch, J.-H., Zinke, C., Hoedemaker, M., Krömker, V. (2014): A field study evaluation of PetrifilmTM plates as a 24-h rapid diagnostic test for clinical mastitis on a dairy farm. *Prev. Vet. Med.* 113, 620–624
- Marchesi, J., Shanahan, F. (2007): The normal intestinal microbiota. *Curr Opin Infect Dis* 20, 508–513
- Mathot, A.G., Beliard, E., Thuault, D. (2003): *Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese. *J. Dairy Sci.* 86, 3068–3074
- McAuliffe, O., Ryan, M.P., Ross, R.P., Hill, C., Breeuwer, P., Abee, T. (1998): Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 439–445
- Meaney, W.J., Twomey, D.P., Flynn, J., Hill, C., Ross, R.P. (2001): The use of a bismuth-based teat seal and the bacteriocin Lacticin 3147 to prevent dry period mastitis in dairy

- cows, in: Proceedings of the British Mastitis Conference, Garstang 2001, Kongr.ber. S. 24–32.
- Mehrzad, J., Paape, M., Burvenich, C. (2010): Role of neutrophils in protection of udder from infection in high yielding dairy cows. *Iran. J. Vet. Res.* 11, 102–118
- Merle, R., Mollenhauer, Y., Hajek, P., Robanus, M., Hegger-Gravenhorst, C., Honscha, W., Käsbohrer, A., Kreienbrock, L. (2013): Monitoring of antibiotic consumption in cattle on agricultural farms. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 126, 318–325
- Metchnikoff, I.I. (1908): *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. Springer Publishing Company, Inc., NewYork
- Mevius, D., Sampimon, O., Sol, J. (2005): Antimicrobial resistance in mastitis organisms as a public health threat, in: Proceedings of 4th IDF International Dairy Conference: Mastitis in Dairy Production - Current Knowledge and Future Solutions. Wageningen 2005, Kongr.ber., S. 102–108
- Middleton, J.R., Luby, C.D., Adams, D.S. (2009): Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: A review and new data. *Vet. Microbiol.* 134, 192–198
- Milchindustrie-Verband e.V. (2015): *Geschäftsbericht 2014/2015. Teil II – Statistischer Anhang*. Milchindustrie-Verband e.V., Berlin
- Millette, M., Luquet, F.M., Lacroix, M. (2007): *In-vitro* growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* fermented milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 314–319
- Molimard, P., Spinnler, H.E. (1996): Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *J. Dairy Sci.* 79, 169–184
- Morgan, S., Ross, R.P., Hill, C. (1997): Increasing Starter Cell Lysis in Cheddar Cheese Using a Bacteriocin-Producing Adjunct. *J. Dairy Sci.* 80, 1–10
- Moroni, P., Gioia, G., Kolar, Q., Mock, L., Ospina, P., Plumed-, C., Rauch, B., Santisteban, C., Smith, J.S., Virkler, P., Welcome, F., Werner, B., Zurakowski, M., Nydam, D. (2015): Emerging pathogens: The latest information on *Klebsiella*, *Prothotheca* and *Lactococci*. in: 54th National Mastitis Council, Annual Meeting Proceedings, Memphis 2015, Kongr.ber., S. 37–49

- Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (2010): Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications. John Wiley & Sons, Ames S. 3-33, 57
- Mulders, J.W.M., Boerrigter, I.J., Rollema, H.S., Siezen, R.J., De Vos, W.M. (1991): Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. Eur. J. Biochem. 201, 581–584
- Nader-Macías, M.E.F., Otero, M.C., Espeche, M.C., Maldonado, N.C. (2008): Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 1387–1395
- Nagahata, H., Horiguchi, M., Tamiya, S., Gondaira, S., Higuchi, H., Kawai, K. (2015): Intramammary infusion of lactic acid bacteria and therapeutic effects on mastitis in dairy cows, in: 17th International Congress on Animal Hygiene, Košice 2015, Kongr. ber., S. 132–133
- Nielsen, C. (2009): Economic Impact of Mastitis in Dairy Cows, Uppsala, Sveriges lantbruksuniv., Diss.
- Oh, S., Kim, S.H., Worobo, R.W. (2000): Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. J. Dairy Sci. 83, 2747–2752
- Oldham, E.R., Daley, M.J. (1991): Lysostaphin: use of a recombinant bactericidal enzyme as a mastitis therapeutic. J. Dairy Sci. 74, 4175–4182
- O’Sullivan, O., O’Callaghan, J., Sangrador-Vegas, A., McAuliffe, O., Slattery, L., Kaleta, P., Callanan, M., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., Beresford, T. (2009): Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. BMC Microbiol. 50, 1-9
- Otero, M.C., Nader-Macías, M.E. (2007): *Lactobacillus* adhesion to epithelial cells from bovine vagina. Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol. 749–757
- Otero, M.C., Nader-Macías, M.E. (2006): Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. Anim. Reprod. Sci. 96, 35–46
- Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R. (2007): Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. Brazilian Arch. Biol. Technol. 50, 521–542

- Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Yang, W., Seyfert, H.M., Nürnberg, G., Schuberth, H.J. (2008): *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. Vet. Res. 39
- Piccart, K., Vásquez, A., Piepers, S., De Vliegher, S., Olofsson, T.C. (2016): Short communication: Lactic acid bacteria from the honeybee inhibit the *in-vitro* growth of mastitis pathogens. J. Dairy Sci. 2, 1–5
- Piepers, S., De Meulemeester, L., de Kruif, A., Opsomer, G., Barkema, H.W., De Vliegher, S. (2007): Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. J. Dairy Res. 74, 478–483
- Pieterse, R., Todorov, S.D. (2010a): Bacteriocins: Exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment. Brazilian J. Microbiol. 41, 542–562
- Pieterse, R., Todorov, S.D. (2010b): Bacteriocins – Exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment. Brazilian J. Microbiol. 542–562
- Pinzón-Sánchez, C., Ruegg, P.L. (2011): Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. J. Dairy Sci. 94, 3397–3410
- Plumed-Ferrer, C., Uusikylä, K., Korhonen, J., von Wright, A. (2013): Characterization of *Lactococcus lactis* isolates from bovine mastitis. Vet. Microbiol. 167, 592–599
- Pol, M., Ruegg, P.L. (2007): Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. J. Dairy Sci. 90, 249–261
- Pot, B., Felis, G.E., Bruyne, K. De, Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J., Vandamme, P. (2014): The genus *Lactobacillus*, in: Lactic Acid Bacteria. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, S. 249–353
- Prescott, S.C., Breed, R.S. (1910): The Determination of the Number of Body Cells in Milk by a Direct Method. J. Infect. Dis. 7, 632–640
- Rainard, P., Riollet, C. (2006): Innate immunity of the bovine mammary gland. Vet. Res. 37, 369–400
- Reid, G. (2006): Probiotics to prevent the need for, and augment the use of, antibiotics. Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. 17, 291–295

- Reid, G., Burton, J. (2002): Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect.* 4, 319–324
- Rogers, L.A., Whittier, E.O. (1928): Limiting factors in the lactic fermentation. *J. Bacteriol.* 16, 211–229
- Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. (2006): Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 234–240
- Ross, R.P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S.M., Ryan, M.P., Twomey, D.P., Meaney, W.J., Hill, C. (1999): Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 76, 337–346
- Ryan, M.P., Flynn, J., Hill, C., Ross, R.P., Meaney, W.J. (1999): The natural food grade inhibitor, lacticin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 2625–2631
- Ryan, M.P., Meaney, W.J., Ross, R.P., Hill, C. (1998): Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2287–2290
- Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C., Ross, R.P. (1996): An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 612–619
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T. (2000): Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84, 197–215
- Saini, V., McClure, J.T., Léger, D., Dufour, S., Sheldon, A.G., Scholl, D.T., Barkema, H.W. (2012): Antimicrobial use on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 95, 1209–1221
- Salminen, S., Von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., De Vos, W.M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sandholm, T. (1998): Demonstration of safety of probiotics - A review. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 93–106
- Sampimon, O.C., Barkema, H.W., Berends, I.M.G. a, Sol, J., Lam, T.J.G.M. (2009): Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative *staphylococci* in Dutch dairy herds. *Vet. Microbiol.* 134, 37–44

- Sandgren, C.H., Waller, K.P., Emanuelson, U. (2008): Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. *Vet. J.* 175, 108–117
- Santman-Berends, I.M.G.A., Lam, T.J.G.M., Keurentjes, J., van Schaik, G. (2015): An estimation of the clinical mastitis incidence per 100 cows per year based on routinely collected herd data. *J. Dairy Sci.* 98, 6965–6977
- Schukken, Y.H., Lam, T.J.G.M., Barkema, H.W. (1997): Towards a better udder health: the biological basis for selection on udder health traits. in: 48th EAAP Annu. Meet., Vienna 1997, Kongr. ber. S.1–10
- Sears, P.M., Smith, B.S., Stewart, W.K., Gonzalez, R.N., Rubino, S.D., Gusik, S. a, Kulisek, E.S., Projan, S.J., Blackburn, P. (1992a): Evaluation of a nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows. *J. Dairy Sci.* 75, 3185–3190
- Sears, P.M., Wilson, D.J., Gonzalez, R.N., Blackburn, P. (1992b) The potential role of antimicrobial proteins in the treatment of bovine mastitis, in: 15 th American Association of Bovine Practitioners Conference, St. Paul 1992, Kongr. ber., S. 138-142
- Seegers, H., Fourichon, C., Beaudeau, F. (2003): Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34, 475–491
- Seegers, J.F.M. (2002): *Lactobacilli* as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol.* 20, 508–515
- Singh, A.K., Ramesh, A. (2008): Succession of dominant and antagonistic lactic acid bacteria in fermented cucumber: Insights from a PCR-based approach. *Food Microbiol.* 25, 278–287
- Soleimani, N.A., Kermanshahi, R.K., Yakhchali, B., Nejad, T. (2010): Antagonistic activity of probiotic *lactobacilli* against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis 4, 2169–2173
- Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Van Sinderen, D. (2005): Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 198-203
- Steenefeld, W., van Werven, T., Barkema, H.W., Hogeveen, H. (2011): Cow-specific treatment of clinical mastitis: An economic approach. *J. Dairy Sci.* 94, 174–188

- Stiles, M.E., Holzappel, W.H. (1997): Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1–29
- Suneel, D., Basappa, K. (2013): Identification and characterization of *Lactococcus garvieae* and antimicrobial activity of its bacteriocin isolated from cow's milk. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 6, 104–108
- Swinkels, J.M., Hogeveen, H., Zadoks, R.N. (2005) A partial budget model to estimate economic benefits of lactational treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 88, 4273–4287
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W. (1976): Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40, 722–756
- Taylor, J.L., Hirsch, A., Mattick, A.T.R. (1949): The treatment of bovine streptococcal and staphylococcal mastitis with nisin. *Vet Rec*, 61, 197-198
- Tenhagen, B., Köster, G., Wallmann, J., Heuwieser, W. (2006): Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.* 89, 2542–2551
- Teuber, M., Geis, A., 2006. The *Genus Lactococcus*, in: *The Prokaryotes*. Springer US, New York, NY, S. 205–228
- Twomey, D.P., Wheelock, A.I., Flynn, J., Meaney, W.J., Hill, C., Ross, R.P. (2000): Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. *J. Dairy Sci.* 83, 1981–1988
- Van den Borne, B. (2010): Impact of bovine subclinical mastitis and effect of lactational treatment. Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde Univ. Utrecht, Diss.
- Vaughan, E.E., Heilig, H.G.H.J., Ben-Amor, K., De Vos, W.M. (2005): Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29(3), 477-490
- Verraes, C., Van Boxtael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaezen, M.A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J., Herman, L. (2013): Antimicrobial resistance in the food chain: A review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 2643–2669

- Vesterlund, S., Karp, M., Salminen, S., Ouwehand, A.C. (2006): *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. *Microbiology* 152, 1819–1826
- Volzing, K., Borrero, J., Sadowsky, M.J., Kaznessis, Y.N. (2012) Antimicrobial peptides targeting Gram-negative pathogens, produced and delivered by lactic acid bacteria. *ACS synthetic biology*, 2(11), 643-650
- Vuyst, L. De, Vandamme, E.J., 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. In: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Springer US, Boston, S. 91-142
- Ward, L.J., Timmins, M.J. (1999): Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 90–92
- Wedlock, D.N., Denis, M., Lacy-Hulbert, J., Buddle, B.M. (2008): Interleukin-1 β infusion in bovine mammary glands prior to challenge with *Streptococcus uberis* reduces bacterial growth but causes sterile mastitis. *Vet. Res. Commun.* 32, 439–447
- Werner, B., Moroni, P., Gioia, G., Lavín-Alconero, L., Yousaf, A., Charter, M.E., Carter, B.M., Bennett, J., Nydam, D.V., Welcome, F., Schukken, Y.H. (2014): Short communication: Genotypic and phenotypic identification of environmental streptococci and association of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* with intramammary infections among different dairy farms. *J. Dairy Sci.* 97, 6964–6969
- White, D.G., McDermott, P.F. (2001): Emergence and transfer of antibacterial resistance. *J. Dairy Sci.* 84, 151–155
- Wu, J., Hu, S., Cao, L. (2007): Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3131–3135
- Zonenschain, D., Rebecchi, A., Morelli, L. (2009): Erythromycin- and tetracycline-resistant *lactobacilli* in Italian fermented dry sausages. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1559–1568

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Zuerst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Volker Krömker, der meine Dissertation betreut und begutachtet hat. Ich danke Ihnen, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, mich mit diesem interessanten und praxisnahen Thema zu beschäftigen.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mikrobiologie der Hochschule Hannover für die hilfreichen Anregungen, die konstruktive Kritik und die lebenserhaltenden Kaffeeeinladungen bedanken. Ein besonderer Dank gilt Jan, der mich vor allem bei der Literatursuche und der Erstellung des ersten Papers sehr unterstützt hat und immer ein Ohr für meine unzähligen Fragen hatte. Bedanken möchte ich mich bei Doris und Steffi, für das schnelle und gründliche Korrekturlesen; Bei Nicole, die für mich unzählige Proben untersucht, als meine persönliche PCR-Expertin alle Fragen beantwortet und meine chaotischen Laborangewohnheiten ertragen hat; Bei Chao, die nicht nur meine Proben mit untersucht hat, sondern immer ein nettes Lächeln parat hatte und bei allen Doktoranden, besonders Matti, Anne, Lina, Klemens, Conny, Marco, Jan und Anne für hilfreiche Tipps, aufbauende Worte vor Vorträgen und die witzigen Ausfahrten nach Leipzig und Deetz.

Mein Dank gilt außerdem den Leitern und Mitarbeitern der Betriebe, die die Probenentnahmen ermöglicht und ihre Tiere für die Versuche zur Verfügung gestellt haben.

Weiterer Dank gilt meinen Freunden, die mich durch die ein oder andere Ablenkung, ihr ständiges Interesse und die aufbauenden Worte immer wieder motiviert haben.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Johanna für den schnellen und hilfreichen Proofreading Service bedanken! Ich weiß deinen Einsatz sehr zu schätzen!

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie. Besonders meinen Eltern: Danke, dass ihr mir alle Wege offengelassen habt, dass ihr mich unterstützt und dass ihr, egal worum es geht, immer da seid! Meiner Schwester: Danke, dass du meine Launen erträgst und für deine Stärkungs-Muffins! Und meinen Großeltern: Danke, dass ihr mir immer ein gutes Gefühl gebt.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Johannes bedanken. Vielen Dank für die unbeschreibliche schöne, gemeinsame Zeit, für deinen Halt und das Mut machen; danke für dein Probevorträge-anhören und tapferes Korrekturlesen nach anstrengenden Arbeitstagen. Es ist „ganz schön gut“, dass wir uns haben und ich freue mich auf alles, was da noch kommt.

