

Aus dem Department für Pathobiologie  
Der Veterinärmedizinische Universität Wien

Institut für Mikrobiologie

(Leiterin: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.rer.nat. Monika Ehling-Schulz)

**Einfluss von Milch und verschiedener C-Quellen auf das  
Wachstumsverhalten von *Staphylococcus aureus***

Bachelorarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Patricia Quant

Wien, im Juli 2020

Betreuer: Dr.rer.nat. Tom Grunert

Gutachterin: Dr.rer.nat. Kathrin Kober-Rychli

## Inhalt

1	Einleitung und Fragestellung .....	1
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	1
1.2	Bovine <i>S. aureus</i> Mastitis .....	2
1.3	<i>Staphylococcus aureus</i> Pathogenese.....	4
1.3.1	Adhäsion .....	5
1.3.2	Koagulase .....	5
1.3.3	Poly- <i>N</i> -acetylglucosamine (PNAG).....	5
1.4	Vorkommen spezifischer kuhassoziierter klonaler Komplexe.....	6
1.5	Wachstum und Metabolismus von Bakterien .....	6
1.5.1	Wachstumsphasen von Bakterien.....	6
1.5.2	Metabolismus .....	8
1.6	Ziel der Arbeit .....	9
2	Materialien und Methodik.....	10
2.1	Herstellung der Medien.....	10
2.2	<i>S. aureus</i> Isolate und Kultivierung .....	11
2.3	Vorbereitung der Messung der Wachstumsdynamik mittels eines automatisierten Multiwellplatten-Messgeräts (Bioscreen C) .....	11
2.3.1	Herstellung der Vorkultur und Vorbereitung des Hauptkulturmediums ...	11
2.3.2	Vorbereitung der Multiwellplatten.....	12
2.4	Auswertung der <i>S. aureus</i> Wachstumskurven .....	13
3	Ergebnisse und Diskussion.....	14
3.1	Auswertung der Wachstumsdynamik von <i>S. aureus</i> .....	14
3.2	Wachstumsdynamik der <i>S. aureus</i> Stämme in Milch .....	16
3.2.1	Vergleich zwischen den klonalen Komplexen boviner <i>S. aureus</i> Isolate	16
3.2.2	Vergleich zwischen bovinen und humanen <i>S. aureus</i> Stämmen.....	17
3.2.3	Vergleichen von bovinen und humanen CC8 Stämmen.....	18
3.3	Kultivierung der Stämme in RPMI mit diversen Supplements .....	20
4	Zusammenfassung .....	23
5	Englisches Summary .....	24
	Abkürzungsverzeichnis .....	25
	Abbildungsverzeichnis .....	26
	Tabellenverzeichnis .....	28

Literaturverzeichnis.....	29
ANHANG .....	33
A1 Liste aller Stämme.....	33
A2 Milch.....	35

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* ist ein wichtiges opportunistisches bakterielles Pathogen (Myles & Datta, 2012). Die Bezeichnung „*Staphylococcus*“ kommt von dem griechischen Wort für Weintrauben (Myles & Datta, 2012) und „*aureus*“ kommt von der goldenen Farbe, die die Bakterien in Kultur aufweisen (Wilson, Winkler & Ho, 2019).

*S. aureus* gehört zu den grampositiven Bakterien. Die Zellwand enthält eine dicke Peptidoglykanschicht, Zelloberflächenproteine, Teichonsäuren und Kohlenhydratpolymere. Diese Bestandteile erfüllen verschiedene Funktionen. Die Peptidoglykanschicht dient zum Beispiel als Schutz vor der osmotischen Zellauflösung, die Zelloberflächenproteine sind notwendig für die Adhäsion, die Biofilm Produktion und für die Immunevasion. Die Teichonsäuren dienen dem Bakterium als Schutz vor kationischen, antimikrobiellen Peptiden. Der korrekte Aufbau der Zellwand ist einerseits von Bedeutung für die Pathogenität von *S. aureus*, andererseits aber auch wichtig für das Wachstum der Bakterien. Daher greifen viele antimikrobielle Mittel in die Synthese der Hauptkomponenten der Zellwand ein (Somerville, 2016).

Obwohl *S. aureus* Krankheiten bei Mensch und Tier verursacht (Fagundes et al., 2010), sind sie nicht ausschließlich als pathogene Organismen anzusehen. Die Virulenzfaktoren von *S. aureus* dienen nicht primär dazu Krankheiten zu verursachen, sondern sind vor allem dazu notwendig, dass die Bakterien überleben, wachsen und sich vermehren (Honeyman, Friedman, & Bendinelli, 2002). Interessant ist, dass relativ wenig darüber bekannt ist, welche molekularen Mechanismen den Wechsel von einem symbiotischen zu einem pathogenen Organismus ermöglichen. *S. aureus* scheint aber die Fähigkeit zu haben sich gut an sich verändernde Umgebungen anpassen zu können und so zu überleben und erfolgreich Infektionen auszulösen (Burnside et al., 2010).

Als Pathogen ist *S. aureus* weltweit für einen Großteil der Mastitis Infektionen bei Wiederkäuern verantwortlich (Guinane et al., 2010).

## 1.2 Bovine *S. aureus* Mastitis

Eine Mastitis entsteht, wenn Bakterien über den Strichkanal in die Milchdrüse einer Kuh eindringen, sich dort vermehren und so eine Entzündung des Euters auslösen. Die Entstehung einer Mastitis wird beispielsweise begünstigt durch einen erhöhten Euterinnendruck, das fehlende Ausspülen der Keime im Zusammenhang mit dem Melkvorgang und das Fehlen der Euter- und Zitzenhygiene (Winter, 2009). Auch durch erhöhten Stress, beispielsweise während dem Östrus oder während der Entbindung kommt es häufiger zu Mastitiden (Paape et al., 1979). Der Krankheitsverlauf einer Mastitis ist dabei abhängig von der Virulenz (Grundmann et al., 2010) und Pathogenität des Erregers, sowie von prädisponierenden Faktoren und dem Funktionszustand der Milchdrüse (Winter, 2009).

Ein Großteil der Mastitiserreger kann durch das angeborene Immunsystem unschädlich gemacht werden. Zu einem Problem kommt es zum Beispiel erst bei einer Euterverletzung. Eine beschädigte Zitzenhaut stellt beispielsweise einen idealen Nährboden für *S. aureus* dar, da dieser gut an verletzter Haut haften und sich vermehren kann. Außerdem kann *S. aureus* auch aktiv in die Zitze eindringen (Winter, 2009). Das ist von Bedeutung, da *S. aureus* einer der Hauptverursacher von boviner Mastitis ist (Boss et al., 2016). Ein wichtiger Faktor für die Immunantwort im Fall einer *S. aureus* Infektion, ist die Funktionsfähigkeit der Leukozyten. Da das Mammagewebe der terminale Endpunkt für Leukozyten ist, befinden sich im Falle einer Infektion oft schon alte, in ihrer Funktion bereits beeinträchtigte Leukozyten-Stadien im Euter. Durch die Leukozyteneinwanderung kommen zusätzlich noch zu junge, unreife Stadien, die auch nicht funktionstüchtig sind, dazu. Die Leukozyten beginnen dann zwar die Bakterien zu phagozytieren, können sie aber nicht vollständig abtöten, da die Leukozyten in ihrer Funktion eingeschränkt sind. Die Bakterien überleben in den Leukozyten und sind so vor den Attacken des Immunsystems geschützt (Winter, 2009).

Die verschiedenen Virulenzfaktoren von *S. aureus* führen zu drei unterschiedlichen klinischen Formen von Mastitis. Die erste Form ist die katarrhalische Mastitis, bei der es zur Emigration von polymorphkernigen Leukozyten (PMN) kommt. Zweitens die granulomatöse Mastitis, an der Toxine beteiligt sind und es zur Granulombildung und zum Entstehen irreversibler Schäden am Parenchym kommt. Die dritte Mastitisart ist die nekrotisierende Mastitis, gekennzeichnet durch  $\alpha$ -Toxine, Ischämie und Schädigung der

PMN (Winter, 2009). Mastitiden werden außerdem auch anhand ihres zeitlichen Krankheitsverlaufes unterschieden, in akute und chronische Mastitiden. Bei einer akuten Mastitis kommt es zu Entzündungssymptomen wie hochgradige Schwellung und Schmerzhaftigkeit des Euters, das Tier kann eine erhöhte innere Körpertemperatur und Schüttelfrost haben. Die chronische Mastitis hingegen führt nur zu Veränderungen des Euters, das Tier selbst erscheint gesund. Die Veränderungen des erkrankten Euters bestehen darin, dass der Mammakomplex kleiner und derber wird und teilweise können Knoten ertastet werden (Winter, 2009). Die Entwicklung chronischer Mastitiden könnte mit bestimmten Eigenschaften von *S. aureus*, wie beispielsweise Biofilmbildung, intrazelluläres Überleben der Bakterien oder der reduzierten Expression einer Polysaccharidkapsel an der Bakterienoberfläche, zusammenhängen (Bardiau et al., 2016) (Grunert et al., 2018). *S. aureus* Isolate, die keine Kapsel ausbilden, können wahrscheinlich einfacher in epitheliale Zellen eindringen. Sobald sich die Bakterien innerhalb der Zellen befinden, könnten sie sich besser vor der Vernichtung durch das Immunsystem schützen und somit eine langfristige chronische Infektion ermöglichen (Tuchscher et al., 2010).

Mastitis bei Wiederkäuern stellt ein Problem dar, da sie einerseits eine verminderte Gesundheit der Tiere bedeutet, und zum Beispiel zu systemischen Infekten führen kann (Le Maréchal et al., 2011). Des Weiteren hat Mastitis ein ernst zu nehmendes zoonotisches Potential, durch die Weiterverbreitung von Bakterien und ihren Toxinen über die Milch (Abebe et al., 2016). Außerdem sind Euterentzündungen auch ökonomisch bedeutsam, da sie zu finanziellen Verlusten bei den Landwirten führen können (Winter, 2009), sowie zu verringerter Milchproduktion und Antibiotikarückständen in der Milch (Abebe et al., 2016). Die finanziellen Verluste entstehen zum Beispiel dadurch, dass Milch erkrankter Tiere nicht mehr verkauft werden kann. Im Falle einer Mastitis kommt es bei der Milch zu vielfältigen Veränderungen. Einerseits steigt der Wasseranteil der Milch, wodurch das Milchsekret eine wässrige bis seröse Konsistenz bekommt. Andererseits kann es zu verschiedenen Beimengungen kommen, wie zum Beispiel Fibrinflocken, Blut oder Eiter (Winter, 2009). Ein Problem bei der Behandlung von Mastitiden, ist das Persistieren von *S. aureus* in den Abwehrzellen, also den Leukozyten, da das eine erfolgreiche Elimination der Erreger durch Antibiotika erschwert (Winter, 2009). Abgesehen von den bisher genannten Problemen, ist auch noch zu erwähnen, dass *S. aureus* nicht nur ein gefährlicher Mastitiserreger ist, sondern

auch durch die Fähigkeit Toxine zu bilden Lebensmittelvergiftungen, z.B. durch den Verzehr von kontaminierter Milch, verursachen kann. Enterotoxine sind diesbezüglich vor allem problematisch, da sie die Fähigkeit haben die herkömmliche Temperatur und Länge des Pasteurisierens zu überleben (Schmid et al., 2009).

Ein Problem des Nachweises von Mastitiden ist, dass bei der mikrobiologischen Untersuchung von Proben, im Fall von *S. aureus*, nicht immer Erreger mit der Milch ausgeschieden werden, obwohl sie im Euter festsitzen. Daher müssen Untersuchungen öfter hintereinander durchgeführt werden, um eindeutige Ergebnisse zu erhalten (Winter, 2009).

### 1.3 *Staphylococcus aureus* Pathogenese

Die Expression von Virulenzfaktoren ist abhängig von der Wachstumsphase, in der sich die Bakterien befinden (Honeyman, Friedman, & Bendinelli, 2002). In der Tabelle aus Honeyman et al. (abgebildet als Abbildung (Abb.) 1) sind die unterschiedlichen Virulenzfaktoren der Wachstumsphase zugeordnet, in der sie auftreten.

**TABLE I**  
**The effect of growth phase on virulence factor production**

Log Phase	Post-Exponential	Constitutive
coagulase	alpha toxin	enterotoxin A
protein A	beta hemolysin	
clumping factor	delta hemolysin	
fibronectin binding proteins	SHTs	
	(gamma hemolysin & PVL)	
fibrinogen binding protein	Exfoliative toxins A & B	
	V8 protease	
	hyaluronate lyase	
	lipase	
	capsular polysaccharide	

Shown are the effect(s) of growth phase on virulence factor expression.

**Abb. 1:** Übersicht über das Auftreten verschiedener Virulenzfaktoren in den unterschiedlichen Wachstumsphasen (entnommen aus Honeyman et al.).

*S. aureus* verfügt über ein sehr umfangreiches Repertoire an Virulenzfaktoren. Da es den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würde alle Faktoren aufzuzählen, die zur Pathogenität von *S. aureus* beitragen, werden nur einige Faktoren beispielhaft beschrieben.

### 1.3.1 Adhäsion

Pathogene brauchen die Fähigkeit an Oberflächen haften zu können. Um dieses Haften an der Wirtsoberfläche zu gewährleisten, produziert *S. aureus* Adhäsine auf der Zelloberfläche. Durch die Adhäsine können die Bakterien an verschiedenen Wirtsstrukturen, wie zum Beispiel an Kollagen, Fibronectin und Lamin, haften bleiben. Das Binden von Staphylokokken an extrazelluläre Matrixproteine wird durch sogenannte „microbial surface component recognition adhesive matrix molecules“ (MSCRAMMS) vermittelt (O’Gara, 2007). Durch die Synchronisierung der MSCRAMMS wird außerdem die Biofilmproduktion begünstigt. Beides, Adhäsion und Biofilmproduktion, sind äußerst wichtige Virulenzfaktoren bei den meisten *S. aureus* Infektionen. MSCRAMMS spielen eine wichtige Rolle bei Infektionen des Mammagewebes bei boviner Mastitis, da normalerweise eine Adhäsion der Bakterien durch den ständigen Efflux der Flüssigkeit nicht stattfinden würde (Somerville, 2016).

### 1.3.2 Koagulase

Staphylokokken können eine Verklumpung des Blutplasmas verursachen, wodurch Leukozyten daran gehindert werden in infizierte Stellen einzuwandern. Dadurch wird die Erkennung der Erreger durch das Immunsystem des Wirtes verhindert. Koagulase kann also als wichtiger Virulenzfaktor von *S. aureus* gesehen werden, da der Koagulationstest von Plasma zur groben Unterscheidung zwischen Koagulase-positiven (inklusive *S. aureus*) und Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) verwendet wird (Somerville, 2016).

### 1.3.3 Poly-N-acetylglucosamine (PNAG)

Um Biofilme bilden zu können, müssen Bakterien sich aggregieren können. Damit es zu einer Adhäsion zwischen Zellen kommt fungieren Exopolysaccharide als interzelluläre Adhäsionskomponenten. Das Hauptexopolysaccharid von *S. aureus*, das als interzelluläres Adhäsionsmolekül auftritt, ist Poly-N-Acetylglucosamin (PNAG). Die chemische Struktur von PNAG wurde zuerst für ein Exopolysaccharid, das bei *Staphylococcus epidermidis* isoliert worden war, beschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass es sich um ein  $\beta(1,6)$ -linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) Polymer handelt (Somerville, 2016).

## 1.4 Vorkommen spezifischer kuhassoziierter klonaler Komplexe

Um verschiedene Isolate von Bakterienstämmen voneinander unterscheiden zu können wird die DNA-Sequenz verschiedener „housekeeping genes“ mit Hilfe des „Multilocus Sequence Typing (MLST)“ charakterisiert. Es gibt sieben „housekeeping genes“, die durch die unterschiedlichen Alleltypen in der Sequenz ihrer DNA, in den verschiedenen Bakterien-Isolaten, unterschieden werden können. Dabei werden 450-500 Basenpaare jedes Gens für eine DNA-Sequenz-Analyse verwendet. Durch die Unterschiede der Allele ergibt sich ein bestimmter „sequence type (ST)“ für jedes Isolat (<https://pubmlst.org/general.shtml>, abgerufen am 16.6.2020).

Durch MLST könnten die verschiedenen *S. aureus* Isolate unterschiedlichen Klonale Komplexe (Clonal Complex: CC) zugeordnet werden (Boss et al., 2016). *S. aureus* Isolate, die für mindestens fünf Allele die gleichen Sequenzprofile zeigen, werden zu einem klonalen Komplex zusammengefasst (<https://www.trillium.de/zeitschriften/trillium-diagnostik/archiv/ausgaben-2015/td-42015/mikrobiologie.html>, zugegriffen am 29.6.2020). Normalerweise besteht ein Klonaler Komplex aus einem vorherrschenden Genotyp und einigen weniger häufigen aber nahe verwandten Genotypen (Feil et al., 2004). Die häufigsten Klonalen Komplexe von *S. aureus* die mit Mastitis in Verbindung stehenden sind CC8, CC705 und CC97. Bei den Klonalen Komplexen gibt es einige die sich von einem human-assoziierten Vorfahren aus entwickelt haben, dazu zählen unter anderem CC5, CC8, und CC97. Im Falle des Klonalen Komplexes 705 hat sich die Änderung von einem humanen zu einem bovinen klonalen Komplex in etwa vor 1500 Jahren ergeben (Boss et al., 2016).

Rinder sind die Hauptverursacher für das Auftreten von tierischen *S. aureus* Klonen, die ansteckend für Menschen sind. Vor allem Stämme aus dem klonalen Komplex (CC)97, die auf mehreren Kontinenten Infektionen beim Menschen verursachen, sind bovinen Ursprungs (Richardson et al., 2018).

## 1.5 Wachstum und Metabolismus von Bakterien

### 1.5.1 Wachstumsphasen von Bakterien

Die verschiedenen Wachstumsphasen sind von großer Bedeutung für die Ausprägung der Virulenzfaktoren von Bakterien (Honeyman, Friedman, & Bendinelli, 2002).

Das Wachstum von Bakterien kann grundsätzlich in mehrere Phasen eingeteilt werden; die „lag“ Phase, die exponentielle „log“ Phase, die stationäre Phase und die Absterbephase (Honeyman, Friedman, & Bendinelli, 2002).

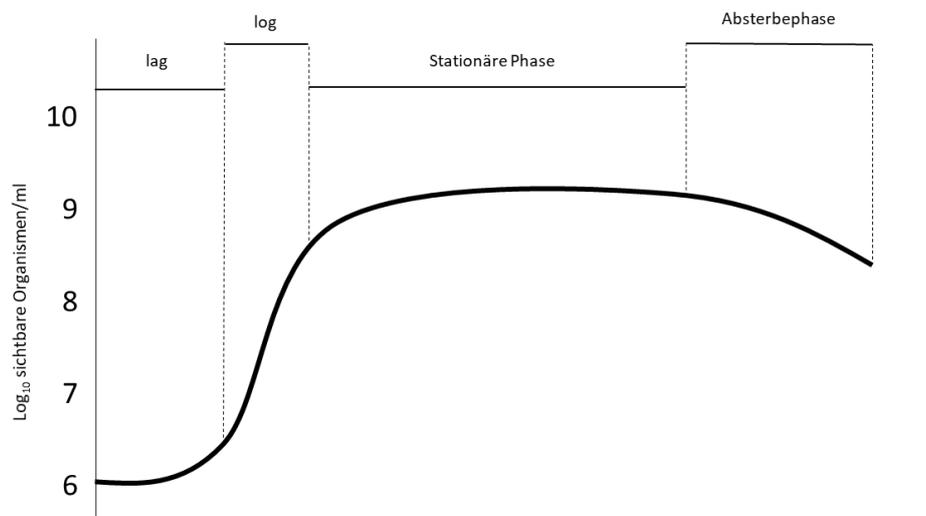
Die „lag“ Phase ist jener Zeitraum den die Bakterien, nachdem sie in ein neues Medium überführt wurden, brauchen, um wieder Wachstum zu zeigen. Dabei ist die Zeit, die die Bakterien in der „lag“ Phase verbringen, abhängig von der Ähnlichkeit des neuen Mediums zu dem Medium, in dem sich die Bakterien vor dem Umsetzen befunden haben. Eine Rolle spielt auch die Wachstumsphase in der sich die Bakterien zum Zeitpunkt des Überführens befunden haben, wenn die Bakterien zum Beispiel während der exponentiellen Wachstumsphase in das gleiche Medium neu überführt werden und dieselben Wachstumsbedingungen vorfinden, findet keine „lag“ Phase statt, sondern die Bakterien beginnen gleich wieder mit exponentiellem Wachstum (Madigan 1949- & Brock 1926- [Begründer des Werks], 2012).

Wachstum wird dann als exponentiell bezeichnet, wenn die Anzahl an Zellen sich während einem konstanten Zeitintervall verdoppelt. Während dem exponentiellen Wachstum teilt sich also jede Zelle und bildet zwei Tochterzellen, diese beiden Zellen teilen sich wiederum, um jeweils zwei neue Zellen zu formen. Wie lange sich diese Zellteilung fortsetzt, hängt zum Beispiel von den vorhandenen Ressourcen ab. Am Anfang des exponentiellen Wachstums steigt die Zellzahl relativ langsam, desto länger die Phase andauert, desto schneller steigt die Zellzahl an. Zellen, die sich in der Phase des exponentiellen Wachstums befinden, sind normalerweise am gesündesten und daher zum Beispiel für Studien zu Enzymen am besten geeignet. Die Phase des exponentiellen Wachstums endet entweder wenn eine wichtige Nahrungsquelle im Medium zu Ende geht oder wenn ein Abfallprodukt der Bakterien sich im Medium ansammelt und so das Wachstum inhibiert (Madigan 1949- & Brock 1926- [Begründer des Werks], 2012).

Bakterien, die sich in der stationären Phase befinden zeigen zwar keine Zunahme in ihrem Wachstum bzw. keine Zellteilung mehr, ihr Stoffwechsel ist aber trotzdem noch aktiv, sie können also zum Beispiel noch Virulenzfaktoren produzieren. Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass Staphylokokken den Großteil ihrer Exoproteine in der post-exponentiellen Phase produzieren. Ausnahmen davon sind Enterotoxin A, das während dem gesamten Wachstum produziert wird und Koagulase, die während der „log“ Phase

produziert wird. Auch Zellwand assoziierten Proteine, werden vermehrt in der „log“ Phase produziert (Honeyman, Friedman, & Bendinelli, 2002).

Wenn die in der stationären Phase angelangten Organismen weiterhin inkubiert bleiben, beginnen sie irgendwann abzusterben. Sobald das passiert, befindet sich eine Population in der Absterbephase. Diese letzte Phase verläuft oft auch exponentiell, allerdings sehr viel langsamer als während dem exponentiellen Wachstum (Madigan 1949- & Brock 1926- [Begründer des Werks], 2012).



**Abb. 2:** Darstellung der verschiedenen Wachstumsphasen (Abbildung angepasst aus Madigan & Brock (2012)).

### 1.5.2 Metabolismus

Als Metabolismus wird das Produkt aus energieproduzierendem Katabolismus (abbauend) und energieverbrauchendem Anabolismus (aufbauend) bezeichnet. Außerdem kann man den Metabolismus bei Mikroorganismen auch in zentralen Metabolismus und intermediären Metabolismus unterteilen. Der zentrale Metabolismus funktioniert über katabole und anabole Prozesse. Durch ihn erhält *S. aureus* die 13 kanonischen Biosynthesewegzwischenprodukte, von denen ausgehend alle Biosynthesevorläufer hergestellt werden. *S. aureus* bevorzugt Kohlenhydrate als C-Quelle, um diese 13 Biosynthesewegzwischenprodukte herzustellen. Falls die Bakterien keinen Zugang zu Kohlenhydraten haben, können sie aber auch einige andere Makromoleküle, wie zum Beispiel Aminosäuren, für die Produktion benutzen (Somerville, 2016).

## 1.6 Ziel der Arbeit

Da die von *S. aureus* verursachte Rindermastitis über ein hohes zoonotisches Potential verfügt und für verschiedenste Krankheiten beim Menschen verantwortlich ist, ist es von Interesse das Wachstum dieser Bakterien in Milch, eines der natürlichen Nährmedien und verschiedenen Bestandteilen dieser, besser zu verstehen. In dieser Arbeit soll daher das Wachstum verschiedener *S. aureus* Isolate in verschiedenen Medien genauer untersucht werden. Dazu wird das Wachstum verschiedener *S. aureus* Isolate für 72 h bei einer Temperatur von 37 °C in elf verschiedenen Medien aufgezeichnet, und diese Daten dann statistisch ausgewertet. Dabei sind die Daten der maximal erreichbaren Biomasse (maximalen optischen Dichte: OD) und die Daten zum Zeitpunkt des Erreichens der OD 0,6 von besonderem Interesse, um eine Aussage über das Wachstum von *S. aureus* treffen zu können.

Um einen Überblick über das Wachstum der verschiedenen Isolate zu erhalten, wurde zuerst das Wachstum aller 144 verschiedenen Isolate in Milch gemonitort. Im Zuge der Analyse der 144 Stämme, konnte genauer überprüft werden, ob es einerseits Unterschiede im Wachstum zwischen den verschiedenen klonalen Komplexen und andererseits zwischen den bovinen Isolaten und jenen Isolaten humaner Herkunft gibt. Anschließend daran wurden ausgewählte Isolate unter dem Einfluss verschiedener C-Quellen genauer betrachtet. Dazu wurden dem Basis-Nährmedium verschiedene Einzelkomponenten der Milch zugeführt. Aus den daraus resultierenden Unterschieden in den Wachstumskurven, kann man sich einen besseren Überblick darüber verschaffen, was ideale Nahrungsquellen für *S. aureus* sind und somit auch durch welche Bestandteile der Milch das Wachstum von *S. aureus* besonders begünstigt wird, was im Falle von Mastitiden von Bedeutung sein könnte.

## 2 Materialien und Methodik

### 2.1 Herstellung der Medien

Zunächst wurden die Bakterien in 1 % „Skim-Milk“ (Thermo Fisher Scientific Inc.) kultiviert. Zur Herstellung der „Skim-Milk“ wurde das „Skim Milk Powder“ in destilliertem Wasser gelöst und anschließend für fünf Minuten bei 121 °C autoklaviert ([http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=LP0031&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=LP0031&c=UK&lang=EN); zuletzt zugegriffen am 10.7.2020).

Außerdem wurden Medien auf Basis des RPMI-1640 (Sigma Aldrich, Merck, Deutschland) Medium hergestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Medien sind in Tabelle (Tab.) 1 zusammengefasst und mit den im weiteren Verlauf der Arbeit verwendeten Abkürzungen bezeichnet.

**Tab. 1**

MEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE	ABKÜRZUNG
RPMI Sigma R1383 - 1L	RPMI
Casein sodium salt; Sigma Aldrich (C8654)	CS
D-Lactose monohydrate; MW=360,31 g/mol; Sigma Aldrich (61339-25G)	L

Das RPMI Medium wurde mit den oben genannten Medienzusätzen aus den in Tab. 1 genannten Bestandteilen gemischt und ist in Tab. 2 abgebildet.

**Tab. 2**

NAME DES MEDIUMS	MEDIENZUSATZ
RPMI	ohne
RPMI CS	1 % CS
RPMI CS+L	1 % CS/ 1 % L
RPMI L	1 % L

Die Medien wurden, nachdem sie gelöst waren, alle auf einen ungefähren pH-Wert von 8 eingestellt. Anschließend wurde jedes Medium steril filtriert.

## 2.2 *S. aureus* Isolate und Kultivierung

Es wurden 144 verschiedene *S. aureus* Isolate verwendet, 14 davon sind humane Isolate. Die Anzahl der Stämme pro Set ist aus Abb. 3 ersichtlich. Die Isolate boviner und humaner Herkunft sind im Anhang in den Abbildungen unter A1 aufgelistet, sowie auch die Medien in denen sie untersucht wurden.

Set	Anzahl der Stämme
Bovine Stämme	100
Humane Stämme	14
Stämme anderer Sets	30

**Abb. 3:** Auflistung der Anzahl der Stämme die jeweils im Set enthalten sind.

Ein genauerer Überblick über die untersuchten bovinen Stämme und ihre Zuordnung zu klonalen Komplexen ist aus der Tabelle im Anhang unter A1 ersichtlich. Grundsätzlich wurden sechs Isolate des klonalen Komplexes 20, zehn Isolate aus CC9, 25 Isolate aus CC705, 36 Isolate aus CC97, 21 Isolate aus CC8 und jeweils ein Isolat aus CC5 und ST152 verwendet.

CC8	CC30	CC5	CC45
n=5	n=3	n=3	n=3
SA01	SA06	SA09	SA12
SA02	SA07	SA10	SA13
SA03	SA08	SA11	SA14
SA04			
SA05			

Und eine Übersicht über die humanen *S. aureus* Isolate und die Zuordnung zu klonalen Komplexen findet sich in Abb. 4.

**Abb. 4:** Darstellung der humanen Stämme in Zusammenhang mit dem jeweiligen Klonalem-Komplex.

Die Isolate wurden bei -80 °C in Glycerol aufbewahrt und zur Kultivierung auf Trypton-Soja-Agar (TSA) Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## 2.3 Vorbereitung der Messung der Wachstumsdynamik mittels eines automatisierten Multiwellplatten-Messgeräts (Bioscreen C)

### 2.3.1 Herstellung der Vorkultur und Vorbereitung des Hauptkulturmediums

Für die Probenvorbereitung für das mikrobiologische Wachstumsmonitoring-System (Bioscreen C, Oy Growth Curves Ab Ltd, Finnland) wurden Übernachtskulturen

hergestellt, indem etwas Bakterienmasse in 3 ml Soja-Casein-Pepton-Medium (TSB) überführt und über Nacht auf 37 °C gestellt wurde. Die optische Dichte (OD) der Übernachtskulturen wurde anhand einer 1:10 Verdünnung, durch eine Messung bei einer Wellenlänge von 600, bestimmt. Dazu wurden 100 µl der Übernachtskultur-Proben und 900 µl TSB in Küvetten pipettiert. Anhand der OD wurde berechnet, wieviel einer 1:5 Verdünnung von Übernachtskultur-Lösung und phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bzw. RPMI schließlich in die Multiwellplatten pipettiert wird, um eine Start-OD von 0,05 zu erreichen. Die Übernachtskulturen wurden für die Inkubation in Milch in PBS 1:5 verdünnt. Bei den supplementierten RPMI Medien wurde RPMI 1:5 verdünnt, um den Bakterien wirklich nur die Nahrungsquellen zur Verfügung zu stellen, die mit dem jeweiligen Medium untersucht werden sollten.

### **2.3.2 Vorbereitung der Multiwellplatten**

#### **2.3.2.1 Milch als Medium**

Die Proben für den Bioscreen setzen sich aus „Skim-Milk“ und den verschiedenen *S. aureus* Isolaten, in der 1:5 Verdünnung, die aus den Übernachtskulturen hergestellt wurde, zusammen. Bei jeder Messung wurden zwei identisch pipettierte Bioscreen Platten für 72 Stunden automatisiert parallel gemonitort. Eine Multiwellplatte für das Bioscreen-Gerät hat 100 Microwells, wovon bei jeder Messung zumindest zehn Microwells pro Platte als Kontrolle für das Medium verwendet wurden. Die restlichen Wells wurden mit den jeweiligen *S. aureus* Isolaten befüllt. Dabei wurde jede dieser Proben zweimal pro Multiwellplatte pipettiert.

#### **2.3.2.2 RPMI als Medium**

Im zweiten Versuch wurde die Milch als Medium durch die verschiedenen RPMI Medien ersetzt. Außerdem wurden nur noch ausgewählte Isolate gemessen. Wie bereits bei den Messungen mit Milch als Medium wurden auch bei RPMI pro Messung zwei gleich pipettierte Platten für 72 Stunden automatisiert parallel gemonitort. Pro Multiwellplatte wurden zwei Werte für jeden Stamm pro Medium gemessen. Die Proben wurde aus der 1:5 Verdünnung der Übernachtskultur entnommen und pro Multiwellplatte zweimal pipettiert.

## 2.4 Auswertung der *S. aureus* Wachstumskurven

Nach Ende des Wachstumsversuchs (72 h) wurden die Daten zu den Wachstumskurven in eine Excel-Datei importiert und weiter statistisch aufbereitet. Aus den Rohdaten der Bioscreen-Messung wurden Mittelwerte aus den vier Messungen von einem *S. aureus* Isolat errechnet. Genauso wurde auch mit den vier (RPMI) oder mehr (Milch) Proben der Medienkontrolle verfahren. Hier wurde der sich daraus ergebende Mittelwert, im Verlauf der weiteren Auswertung als Medium-„blank“ Wert behandelt. Dieser Medium-„blank“ Wert wurde anschließend von den Mittelwerten der Stämme abgezogen, um einen bereinigten Wert des Wachstums der Isolate zu erhalten.

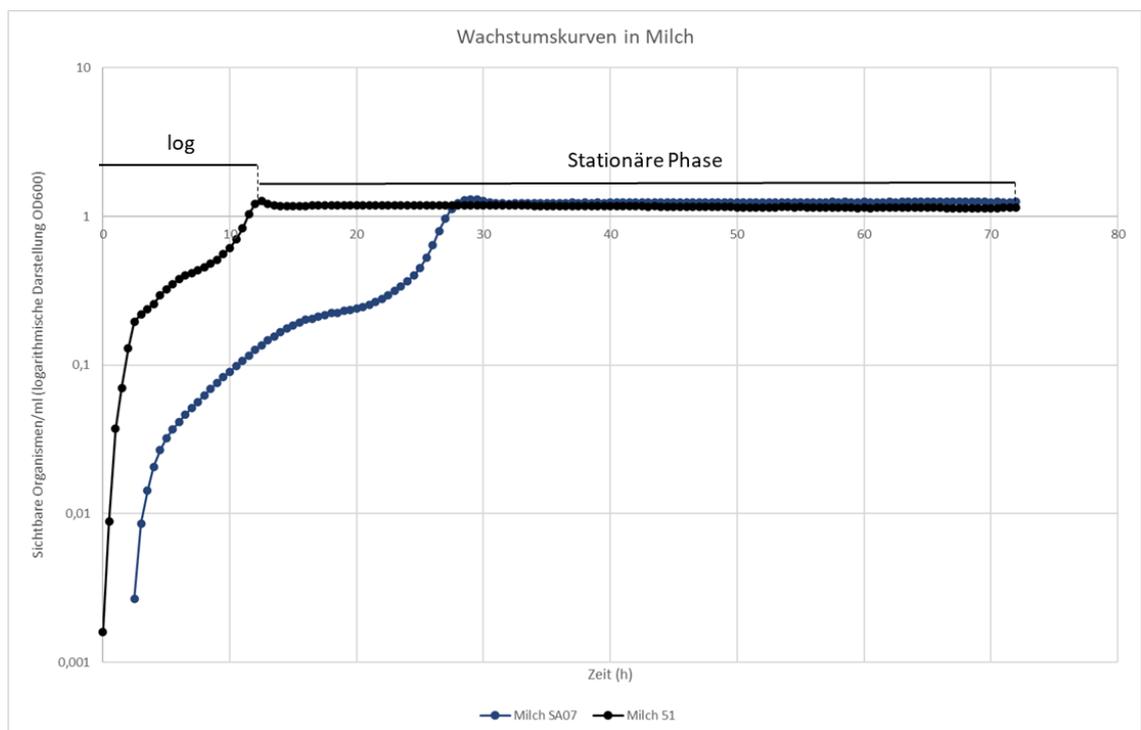
Ausgehend von den so erhaltenen OD-Werten wurde zwei Werten besondere Aufmerksamkeit geschenkt, um das Wachstum der Isolate vergleichen zu können. Zum einen wurden die Werte der maximalen OD herausgesucht und es wurden die Zeitpunkte des Erreichens einer OD von 0,6 zum Vergleich des Wachstumsverhaltens der Stämme herangezogen. Der Zeitpunkt der OD von 0,6 wurde deshalb gewählt, weil es in etwa dem Zeitpunkt entspricht, zu dem die Isolate meistens ein deutliches Wachstum zeigen und somit grob Rückschlüsse auf die „lag“ Zeit ermöglichen.

Diese beiden Gruppen von Vergleichswerten wurden anschließend mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism verglichen. Dazu wurden non-parametrische Tests gemacht. Für den Vergleich aller bovinen Stämme wurden ein Kurskal-Wallis Test und Dunn's Test zur Korrektur von Mehrfachtestungen gemacht. Für die Vergleiche zwischen den zwei Gruppen aller bovinen und humanen Isolate und den Vergleich zwischen dem bovinen CC8 und humanem CC8 wurde ein Mann-Whitney Test gemacht. Als statistisch signifikant wurden Signifikanzwerte die über 0,05 ( $p < 0,05$ ) lagen angenommen.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

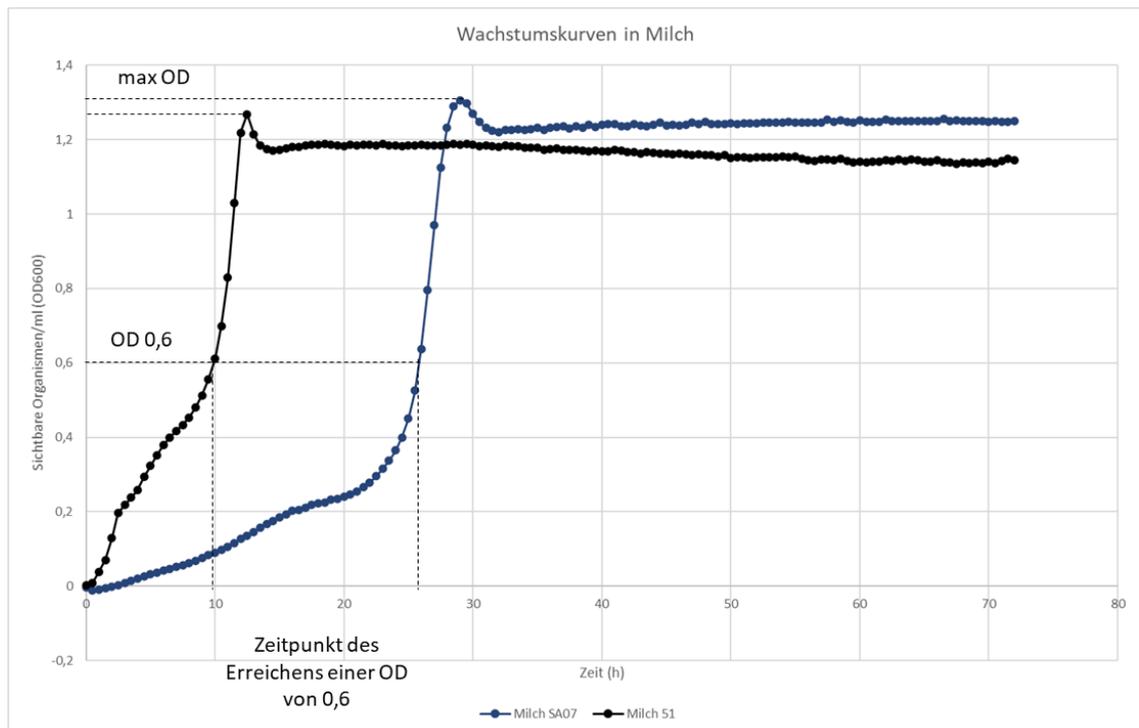
#### 3.1 Auswertung der Wachstumsdynamik von *S. aureus*

Die erhaltenen Wachstumskurven wiesen größtenteils Unterschiede bei der Wachstumsdynamik auf. Da nicht alle Wachstumskurven einzeln durchbesprochen werden können, soll stellvertretend die Wachstumskurve eines bovinen Stammes (BOV51) und eines Stammes humaner Herkunft (SA07) im Medium „Skim-Milk“ als Beispiel betrachtet werden.



**Abb. 5:** Logarithmische Darstellung (OD600) der Wachstumsphasen des bovinen *S. aureus* Stammes 51 und des human-assoziierten Stammes SA07 im Medium „Skim-Milk“. Automatisch gemonitort mittels Bioscreen C für 72 h.

Um die erhaltenen Daten und Wachstumskurven besser miteinander vergleichen zu können, wurden zwei Vergleichspunkte gewählt. Zum einen wurde die maximal erreichbare Biomasse bzw. die maximale optische Dichte herangezogen. Des Weiteren wurde der Zeitpunkt des Erreichens einer optischen Dichte von 0,6 verwendet. Dadurch kann grob die „lag“-Zeit, also die Zeit zur Umstellung/Anpassung auf das neue Medium, abgeschätzt werden.



**Abb. 6:** Boviner *S. aureus* Stamm 51 und human-assoziiertes Stamm SA07 im Medium „Skim-Milk“. Eingezeichnet sind die maximale optische Dichte und der Zeitpunkt des Erreichens einer OD von 0,6, zur Verdeutlichung der zum Vergleich zwischen den Isolaten gewählten OD-Werten oder Zeitpunkten. Darstellung der Messergebnisse von OD600.

Das Wachstum von Bakterien spielt unter anderem auch eine Rolle bei der Regulation von Virulenzfaktoren. *S. aureus* kann durch die Interaktion eines *quorum sensing* Mechanismus die Nähe zu anderen Bakterien feststellen. Außerdem kommt es während der frühen exponentiellen Wachstumsphase zur Expression von Oberflächen-assoziierten Produkten, während in der postexponentiellen Phase extrazelluläre Faktoren erzeugt werden (Sharer et al., 2003).

Eine erhöhte Wachstumsrate ist außerdem einer von vielen Faktoren, die zur Virulenz von *S. aureus* bei Mastitiden beiträgt (Sharer et al., 2003).

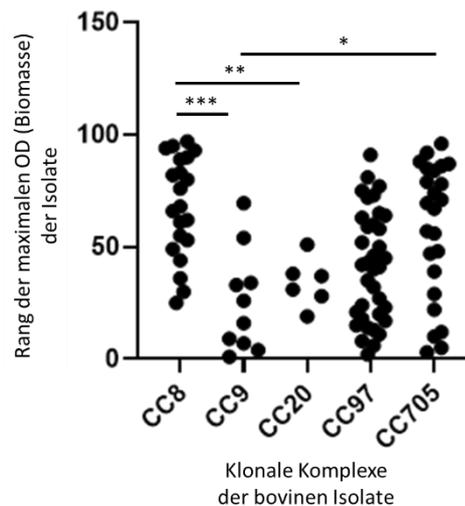
## 3.2 Wachstumsdynamik der *S. aureus* Stämme in Milch

### 3.2.1 Vergleich zwischen den klonalen Komplexen boviner *S. aureus* Isolate

Die verschiedenen klonalen Komplexe der bovinen *S. aureus* Isolate könnten ein unterschiedliches Wachstumsverhalten in Milch aufweisen. Um mögliche Unterschiede im Wachstum zwischen den klonalen Komplexen der bovinen *S. aureus* Isolate genauer zu untersuchen, wurden die fünf klonalen Komplexe in Bezug auf die Werte der maximalen OD und dem Zeitpunkt des Erreichens der OD 0,6 (Zeit bei OD 0,6) untersucht. Dazu wurden die Daten, die mittels automatischen Wachstumsmonitoring-Systems (Bioscreen C) generiert wurden, statistisch mit einem non-parametrischen Test (Kruskal-Wallis Test und Dunn's Test zur Korrektur von Mehrfachtestungen) durch das Programm GraphPad Prism aufbereitet.

#### 3.2.1.1 Vergleich aller fünf klonalen Komplexe bei maximaler OD

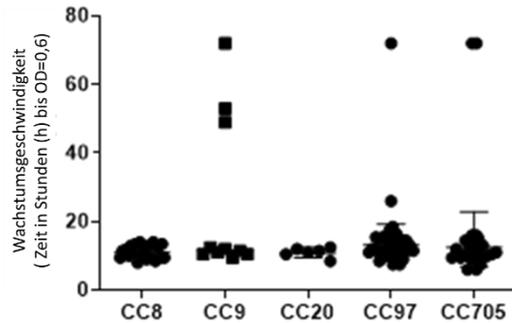
Bei einem Vergleich der klonalen Komplexe bei maximaler OD, erwiesen sich die Unterschiede zwischen CC8 und CC9, CC8 und CC97 sowie CC9 und CC705 als signifikant (Abb. 7).



**Abb. 7: Vergleich aller fünf bovinen klonalen Komplexe bei maximaler OD.** Die Bakterien wurden über 72 h, bei 37 °C in Milch wachsen gelassen und ihr Wachstum von einem automatischen Wachstumsmonitoring-System (Bioscreen C) aufgezeichnet. Verglichen werden alle bovinen Stämme (siehe Tabelle unter A1) in Bezug auf ihren klonalen Komplex. Zum Vergleich wurde nur die maximal erreichte OD der Bakterien-Isolate herangezogen. Dadurch konnten die Signifikanzen zwischen den klonalen Komplexen ermittelt werden.

### 3.2.1.2 Vergleich der fünf klonalen Komplexe bei t=OD 0,6

Der Vergleich der bovinen Komplexe zum Zeitpunkt des Erreichens der OD=0,6 zeigte, dass es keine signifikanten Unterschiede gibt (Abb. 8). Die meisten der bovinen Stämme haben innerhalb von 20 h eine OD von 0,6 erreicht.



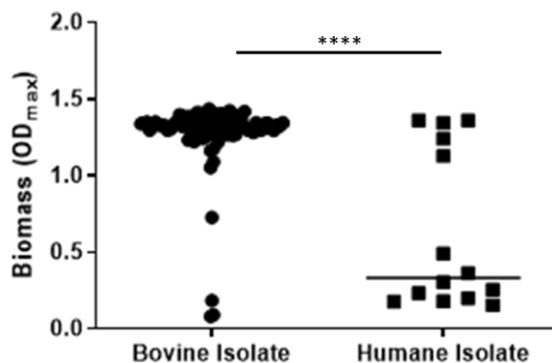
**Abb. 8: Vergleich aller fünf bovinen klonalen Komplexe zum Zeitpunkt des Erreichens von OD 0,6.** Das Wachstum der Bakterien wurden für 72 h bei 37 °C in Milch von einem automatischen Wachstumsmonitoring-System (Bioscreen C) aufgezeichnet.

### 3.2.2 Vergleich zwischen bovinen und humanen *S. aureus* Stämmen

Da *S. aureus* nicht nur zu Krankheiten bei Tieren sondern auch zu Krankheiten beim Menschen führen kann (Honeyman, Friedman, & Bendinelli, 2002), ist es von Interesse zu wissen, ob es unter denselben Wachstumsbedingungen zu Unterschieden im Wachstum zwischen humanen und bovinen Isolaten kommt. Die Daten wurden zuerst nach den Werten der maximalen OD sowie den Zeitpunkten des Erreichens der halben maximalen OD aufbereitet und anschließend mit einem Mann-Whitney Test statistisch analysiert.

#### 3.2.2.1 Vergleich der bovinen vs. humanen Stämme bei max. OD

Der Vergleich aller humanen mit allen bovinen Stämmen bei maximaler OD zeigte, dass der Unterschied signifikant ist (Abb. 9).



**Abb. 9: Vergleich aller humanen mit allen bovinen *S. aureus* Isolaten bei maximaler OD.** Die Isolate wurden für 72 h bei 37 °C in Milch wachsen gelassen und alle halben Stunden das Wachstum automatisch durch ein Wachstumsmonitoring-System (Bioscreen C) aufgezeichnet.

### 3.2.2.2 Vergleich des Zeitpunkts des Erreichens von OD=0,6 bei bovinen vs. humanen Stämmen

Auch im Vergleich zwischen allen humanen und bovinen Stämmen in der Zeit des Erreichens von OD=0,6 ist ein signifikanter Unterschied zu sehen (Abb. 10).

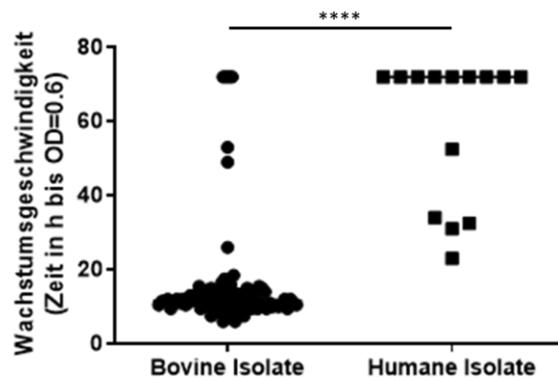


Abb. 10: Vergleich aller humanen und bovinen Stämme bei OD 0,6. Durch ein automatisches Wachstumsmonitoring-System (Bioscreen C) wurde das Wachstum aller bovinen und humanen Isolate (siehe Tabelle unter A1) in Milch bei 37 °C für 72 h aufgezeichnet.

### 3.2.3 Vergleichen von bovinen und humanen CC8 Stämmen

Um den eventuellen Einfluss des genetischen Hintergrundes zu verkleinern, wurden zum Vergleich bovine vs. humane Stämme innerhalb des gleichen klonalen Komplexes (CC8) herangezogen. Verglichen wurden wieder die Werte der maximalen OD und der Zeitpunkt des Erreichens der OD=0,6. Diese Werte wurden aus den aufbereiteten Datenreihen herausgelesen und anschließend mittels eines Mann Whitney U Test statistisch verglichen.

#### 3.2.3.1 Vergleich der maximalen OD zwischen CC8 BOV und CC8 Human

Im Vergleich der klonalen Komplexe 8 (CC8) zwischen humanen und bovinen *S. aureus* Isolaten ist zu erkennen, dass der Unterschied bei maximaler OD signifikant ist (Abb. 11).

Bovine CC8 Stämme erreichen eine höhere maximale OD als die humanen Stämme vom gleichen CC (Abb.11).

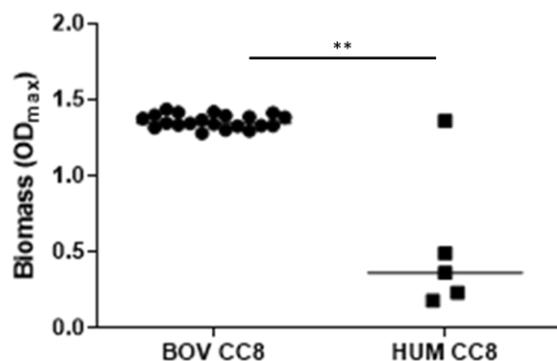


Abb. 11: Vergleich zwischen CC8 BOV und CC8 human bei maximaler OD. Die *S. aureus* Isolate der beiden klonalen Komplexe wurden für 72 h bei 37 °C in Milch wachsen gelassen. Dieses Wachstum wurde durch ein automatisches Wachstumsmonitoring-System (Bioscreen C) aufgezeichnet.

### 3.2.3.2 Vergleich von t bei OD = 0,6 zwischen bovinen und humanen CC8 Stämmen

Auch der Zeitpunkt des Erreichens der OD=0,6 zeigte signifikante Unterschiede zwischen den bovinen und den humanen Stämmen des klonalen Komplexes CC8 (Abb. 12).

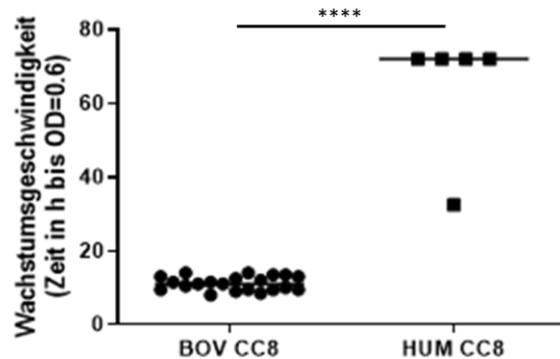


Abb. 12: Vergleich zwischen CC8 Bov und CC8 human bei OD=0,6. Durch ein automatisches Wachstumsmonitoring-System (Bioscreen C) wurde das Wachstum der *S. aureus* Isolate in Milch für 72 h bei 37 °C aufgezeichnet.

*S. aureus* kann verschiedenste Wirte kolonisieren bzw. infizieren und zwischen diesen wechseln.

Der Mensch ist dabei die Wirtspezies, von der die häufigsten Wirtswechsel ausgehen. Die häufigsten Empfänger, für einen *S. aureus* Wechsel vom Menschen aus, sind Rinder. Im Mittel ist es zu 14 Wirtswechseln von Mensch zu Rind zwischen 2000 v. Chr. und 2012 n. Chr. gekommen. Außerdem stellen Rinder auch den Hauptwirten dar, von dem aus es Wirtswechsel zum Menschen gibt (Richardson et al., 2018).

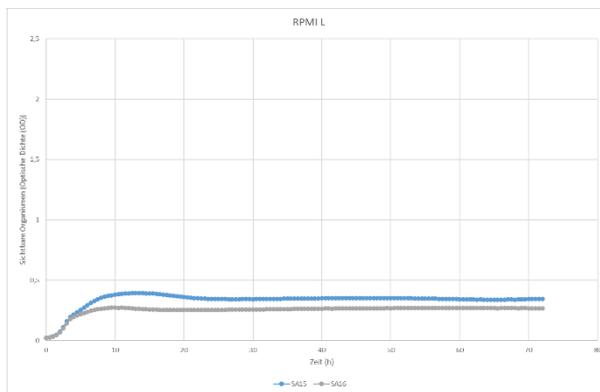
Dieses nähere Verhältnis zwischen humanen und bovinen *S. aureus* Stämmen zeigt sich auch in der positiven Selektion ähnlicher biologischer „Pathways“. Bei beiden Spezies gab es eine positive Selektion bei der Biosynthese von Aminosäuren und beim Transport und Metabolismus von Kohlenhydraten. Mit dem Unterschied, dass die Kohlenhydrate, die beim humanen Metabolismus eine Rolle spielen Monosaccharide sind, während im bovinen Stoffwechsel Disaccharide, wie Lactose, wichtig sind. Bei genauerer Betrachtung des Metabolismus von Laktose ist zu erkennen, dass bovine *S. aureus* Isolate möglicherweise in der Lage sind besser Laktose zu verstoffwechseln, als die Isolate humaner Herkunft (Richardson et al., 2018).

Diese Unterschiede im Metabolismus zwischen den Kohlenhydratarten scheinen möglicherweise auch in unseren Versuchen eine Rolle zu spielen. Die bovinen Stämme zeigen in unseren Versuchen ein höheres Wachstum und sie erreichen schneller eine OD von 0,6 als die humanen Stämme. Daher könnte man darauf schließen, dass der Stoffwechsel der bovinen Stämme besser an die Milch, die sie als Hauptnahrungsquelle erhalten haben, angepasst ist, als der der humanen Stämme.

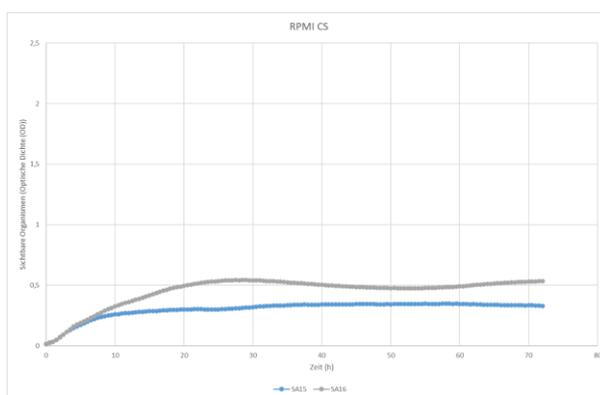
Laktose könnte außerdem auch in Zusammenhang mit der Virulenz von *S. aureus* bei Mastitis stehen. Durch die erhöhte Expression eines Laktose-Transporters wird in einem Laktose-reichen Umfeld das Wachstum der Bakterien beeinflusst (Sharer et al., 2003).

Um ein besseres Bild davon zu bekommen auf welche Kohlenstoffquellen innerhalb der Milch das primäre Wachstum von *S. aureus* zurückgeführt werden kann, wurden Versuche gemacht, bei denen dem RPMI Medium verschiedene Zusätze (wie Casein, Caseinhydrolysat oder Laktose) einzeln oder in Kombination hinzugefügt wurden.

### 3.3 Kultivierung der Stämme in RPMI mit diversen Supplements



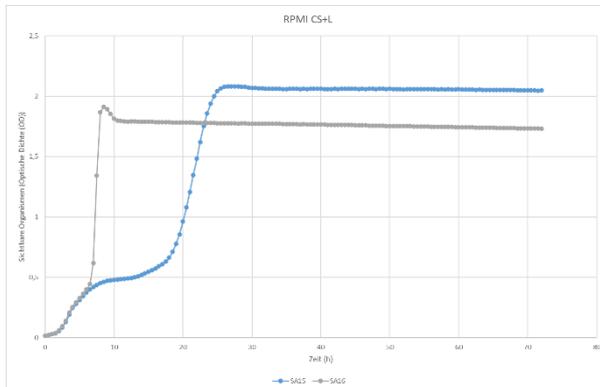
**Abb. 13: Wachstum der Stämme SA15 (blau) und SA16 (grau).** Durch ein automatisches Wachstumsmonitoring System (Bioscreen C) wurde das Wachstum der *S. aureus* Stämme für 72 h aufgezeichnet. Das Medium ist eine Zusammensetzung des Basismediums RPMI und dem Zusatz von Laktose.



**Abb. 14: Wachstum der Stämme SA15 (blau) und SA16 (grau).** Mittels automatischem Wachstumsmonitoring Systems (Bioscreen C) wurde das Wachstum der *S. aureus* Stämme für 72 h aufgezeichnet. Das Medium setzt sich aus dem Basismedium RPMI und dem Zusatz von Casein zusammen.

Beispielhaft für alle generierten Daten sollen die beiden bovinen Isolate SA15 und SA16 in den Medien (i) RPMI mit 1 % Casein, (ii) RPMI mit 1 % Laktose und die (iii) Kombination aus beiden, RPMI mit 1 % Laktose und 1 % Casein untersucht werden. Diese beiden Isolate wurden aus den verschiedenen in RPMI untersuchten Isolaten ausgewählt, da sie den Unterschied im Wachstumsverhalten der Bakterien durch den Einfluss der verschiedenen Zusätze gut repräsentieren. Abb. 13 ist eine Darstellung der Isolate im Medium RPMI+L und man kann erkennen, dass das Wachstum der Bakterien nicht über eine OD von 0,45 hinausging. Auch im Medium RPMI+CS (Abb.14) steigt die maximal erreichte OD der Stämme nicht über 0,6 an. Im Gegensatz dazu kann man an Abb. 15 erkennen, dass durch den Zusatz von Casein und Laktose zu dem Grundmedium RPMI das

Wachstum der Bakterien auf eine ungefähre OD von 2 gestiegen ist. Da das Wachstum



**Abb. 15: Wachstum der Stämme SA15 (blau) und SA16 (grau).** Mittels eines automatischen Wachstumsmonitoring Systems (Bioscreen C) wurde das Wachstum der *S. aureus* Stämme für 72 h aufgezeichnet. Das Medium besteht aus dem Basismedium RPMI und den beiden Zusätzen Laktose und Casein.

der Isolate bei einem Medium mit dem Zusatz von entweder Casein oder Laktose geringer ausfällt als in einem Medium mit der Kombination beider, liegt die Vermutung nahe, dass das gesteigerte Wachstum im Medium RPMI CS+L an dem Zusatz beider Stoffe liegt. Die Stämme sind also bei der Kombination der Zusätze aktiver, als bei einem Medium, das die Komponenten einzeln enthält.

Viele Pseudogene, die bei *S. aureus* in Zusammenhang mit dem Transport von Nährstoffen, wie Kohlenhydraten, stehen sind in bovinen Isolaten über-repräsentiert. Daraus könnte man schließen, dass die bovinen Stämme, je nach Vorhandensein der Nährstoffe, ihren Metabolismus verändern (Richardson et al., 2018).

In unserem Fall ist Stamm SA16 proteolytisch aktiv. Das bedeutet dieser Stamm kann Proteine besser spalten und die als Nahrungsquelle dienenden Bestandteile schneller und in größeren Mengen verdauen. Dadurch scheint er in einem Medium das als Zusatz Casein enthält bessere Wachstumsvoraussetzungen zu haben (vgl. Abb. 14). Stamm SA15 dagegen weist keine proteolytische Aktivität auf, kann damit Proteine nicht in kleinere Peptidketten bzw. Aminosäuren spalten und kann dementsprechend das im Medium vorhandene Casein nicht als Nahrungsquelle nutzen. Zudem scheint der Metabolismus dieses Stammes besser mit einem Medium, das Laktose enthält, umgehen zu können (vgl. Abb. 13). Da bei unseren Versuchen, die höchsten Werte im Wachstum erreicht wurden, wenn dem Medium Laktose und Casein zugesetzt worden war, scheint das die bevorzugte Nahrungsquelle unserer *S. aureus* Isolate zu sein (vgl. Abb. 15). Zudem wächst der proteolytisch aktive Stamm SA16 schneller im Vergleich zum Stamm ohne proteolytische Aktivität (SA15), was auf eine bessere Verwertung des Caseins hindeutet (Abb. 14).

Pathogene bevorzugen meistens ein bestimmtes Kohlenhydrat oder einen bestimmten Kohlenhydratmix als Quelle ihrer Ernährung. Bei Bakterien, die es gewohnt sind, sich gegen andere, um ihre bevorzugte Nahrungsquelle durchsetzen zu müssen, um ihr bestmögliches Wachstum zu erreichen, kommt es häufig zur sogenannten katabolischen Repression. Die katabolische Repression ist bei Bakterien ein sehr häufiges Regulationssystem, sie funktioniert indem Bakterien das Vorhandensein oder Zunehmen einer bevorzugten Kohlenhydratquelle wahrnehmen. Gleichzeitig wird auch die Expression von Enzymen induziert, die gebraucht werden, um die Nahrungsquelle zu verstoffwechseln und die Transkription anderer katabolischer Systeme wird inhibiert. Sobald die vorhandene Menge der bevorzugten Energiequelle sinkt, wird die Repression der alternativen metabolischen Stoffwechselwege aufgehoben (Olive & Sassetti, 2016).

Man kann nun spekulieren, dass die humanen *S. aureus* Stämme schlechter an eine glukosearme Umgebung angepasst sind und über eine stärker ausgeprägte katabolische Repression verfügen. Um diese Vermutung und die vorgenommenen präliminären Versuche zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

## 4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Milch und unterschiedlicher Kohlenstoffquellen auf das Wachstum verschiedener *Staphylococcus aureus* Isolate untersucht. *S. aureus* ist ein grampositives Bakterium, das einerseits als harmloses Bakterium vorkommt, andererseits als Pathogen. *S. aureus* ist einer der Hauptverursacher von Euterentzündungen bei Milchkühen (Bovine Mastitis). Mastitiden sind ökonomisch bedeutsam, da sie durch verminderte Milchleistung und Produktionsausfälle bei der Milchverarbeitung zu finanziellen Verlusten führen können. *S. aureus* ist als Mastitiserreger aber nicht nur ein Problem für die Milchwirtschaft, sondern kann durch die Fähigkeit Toxine zu bilden, durch den Verzehr von kontaminierter Milch oder Milchprodukten, auch Lebensmittelvergiftungen beim Menschen verursachen.

Über die metabolische Anpassung von *S. aureus* an das Eutermilieu, insbesondere der Milch bzw. deren Hauptbestandteile, ist bisher nur wenig bekannt. Um also besser verstehen zu können welche Milchbestandteile wichtig für das Wachstum von *S. aureus* sind, wurden in dieser Arbeit einige verschiedene Kohlenstoffquellen genauer untersucht. Die Ergebnisse zeigen beispielsweise, dass *S. aureus* in einem Medium das als Hauptbestandteil Lactose enthält, vergleichsweise wenig wächst. Genauso verhält es sich auch in einem Medium mit Casein, dem Hauptprotein der Milch. Dagegen ist das Wachstum der Bakterien in einem Medium aus der Kombination von Lactose und Casein sehr viel größer im Vergleich zum Wachstum der Bakterien in den Einzelkomponenten.

Untersucht wurden auch die Unterschiede im Wachstum der verschiedenen *S. aureus* Isolate im Medium Milch. Dabei kam heraus, dass es ein signifikant schnelleres Wachstum der bovinen gegenüber den Isolaten humaner Herkunft gibt. Gleichfalls wachsen die bovinen Isolate schneller als die humanen Isolate in Milch, auch wenn sie ähnlicher phylogenetischer Herkunft (vom gleichen Klonalen Komplex) abstammen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Studie Hinweise auf eine spezifische metabolische Anpassung der bovinen *S. aureus* Stämme an die Nährstoffverhältnisse im Euter (Milch) liefert. Um diese Aussage zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

## 5 Englisches Summary

The aim of this study was to investigate the impact of milk and different milk-derived carbohydrate sources on the growth of *S. aureus* isolates. *S. aureus* is a gram-positive bacterial pathogen as well as a commensal. *S. aureus* is the major cause of udder infections in cows (bovine mastitis). Mastitis is of economic importance because it leads to financial losses due to reduced milk yield and production losses in milk processing. However, *S. aureus* is not only a problem for the dairy industry: since it can also produce heat-stable toxins, which can cause food poisoning in humans, by consuming contaminated milk or dairy products.

Until now, only little is known about the metabolic adaptation of *S. aureus* to the udder microenvironment, particularly to milk or its main nutrients. To improve our understanding about the possible role of milk for the growth of *S. aureus* several different milk-derived carbon sources were investigated in this study.

Results show that *S. aureus* growth is less prominent in a medium containing either lactose, the main carbohydrate nutritional component or casein, the main protein component in milk. Interestingly, a medium containing a combination of lactose and casein enables *S. aureus* apparently to a better growth than media including only one of the components.

Furthermore, the differences in growth of the different *S. aureus* isolates in the medium milk were also examined. Preliminary data show a significant faster growth of bovine isolates compared to isolates of human origin, even if they are of similar phylogenetic origin (from the same clonal complex).

Taken together, this study indicates a specific metabolic adaptation of bovine *S. aureus* lineages to the udder nutritional environment (milk). However, further experiments are necessary to confirm these interesting results.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Albumin Frak. V, pH5.2 (2834.2)
Abb.	Abbildung
CC	Clonal Complex (Klonale Komplexe)
CH	Casein hydrolysat, standard; MW =198, 17 g/mol; ROTH CARL (Art.-Nr.AE41.1)
C-Quellen	Kohlenstoffquellen
CS	Casein sodium salt; Sigma Aldrich (C8654)
G	D-(+)-Glucose monohydrate; MW=198,17 g/mol; Sigma Aldrich (16301-1KG)
GlcNAc	$\beta$ (1,6)-linked N-acetylglucosamine
GN	N-Acetyl-D-glucosamine; MW=221,21 g/mol; Sigma Aldrich (A3286-25G)
GS	L-Glutamine solution bioextra; Sigma Aldrich (G7513-100ML)
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
L	D-Lactose monohydrate; MW=360,31 g/mol; Sigma Aldrich (61339-25G)
log	logarithmisch
MLST	Multilocus Sequence Typing
MSCRAMMS	microbial surface component recognition adhesive matrix molecules
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PMN	polymorphonuclear leukocytes (polymorphkernige Leukozyten)
PNAG	Poly-N-Acetylglucosamin
RPMI	<b>R</b> oswell <b>P</b> ark <b>M</b> emorial <b>I</b> nstitute / RPMI Sigma R1383 - 1L
S.	Staphylococcus
ST	sequence type
Tab.	Tabelle
TSA	Trypton-Soja-Agar
TSB	Soja-Casein-Pepton-Medium

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Übersicht über das Auftreten verschiedener Virulenzfaktoren in den unterschiedlichen Wachstumsphasen (entnommen aus Honeyman et al.)..... 4
- Abb. 2: Darstellung der verschiedenen Wachstumsphasen (Abbildung angepasst aus Madigan & Brock (2012)). ..... 8
- Abb. 3: Auflistung der Anzahl der Stämme die jeweils im Set enthalten sind. .... 11
- Abb. 4: Darstellung der humanen Stämme in Zusammenhang mit dem jeweiligen Klonalem-Komplex. .... 11
- Abb. 5: Darstellung der Wachstumsphasen des bovinen *S. aureus* Stammes 51 und des human-assoziierten Stammes SA07 im Medium „Skim-Milk“. Automatisch gemonitort mittels Bioscreen C für 72 h..... 14
- Abb. 6: Boviner *S. aureus* Stamm 51 und human-assoziiertes Stamm SA07 im Medium „Skim-Milk“. Eingezeichnet sind die maximale optische Dichte und die halbe maximale optische Dichte, zur Verdeutlichung der zum Vergleich zwischen den Isolaten gewählten OD-Werten oder Zeitpunkten. .... 15
- Abb. 7: Vergleich aller fünf bovinen klonalen Komplexe bei maximaler OD. Die Bakterien wurden über 72 h, bei 37 °C in Milch wachsen gelassen und ihr Wachstum von einem automatischen Wachstumsmonitoring-System (Bioscreen C) aufgezeichnet. Verglichen werden alle bovinen Stämme (siehe Tabelle unter A1) in Bezug auf ihren klonalen Komplex. Zum Vergleich wurde nur die maximal erreichte OD der Bakterien-Isolate herangezogen. Dadurch konnten die Signifikanzen zwischen den klonalen Komplexen ermittelt werden. .... 16
- Abb. 8: Vergleich aller fünf bovinen klonalen Komplexe zum Zeitpunkt des Erreichens von OD 0,6. Das Wachstum der Bakterien wurden für 72 h bei 37 °C in Milch von einem automatischen Wachstumsmonitoring-System (Bioscreen C) aufgezeichnet..... 17
- Abb. 9: Vergleich aller humanen mit allen bovinen *S. aureus* Isolaten bei maximaler OD. Die Isolate wurden für 72 h bei 37 °C in Milch wachsen gelassen und alle halben

- Stunden das Wachstum automatisch durch ein Wachstumsmonitoring-System (Bioscreen C) aufgezeichnet. .... 17
- Abb. 10: Vergleich aller humanen und bovinen Stämme bei OD 0,6. Durch ein automatisches Wachstumsmonitoring-System (Bioscreen C) wurde das Wachstum aller bovinen und humanen Isolate (siehe Tabelle unter A1) in Milch bei 37 °C für 72 h aufgezeichnet. .... 18
- Abb. 11: Vergleich zwischen CC8 BOV und CC8 human bei maximaler OD. Die *S. aureus* Isolate der beiden klonalen Komplexe wurden für 72 h bei 37 °C in Milch wachsen gelassen. Dieses Wachstum wurde durch ein automatisches Wachstumsmonitoring-System (Bioscreen C) aufgezeichnet. .... 18
- Abb. 12: Vergleich zwischen CC8 Bov und CC8 human bei OD=0,6. Durch ein automatisches Wachstumsmonitoring-System (Bioscreen C) wurde das Wachstum der *S. aureus* Isolate in Milch für 72 h bei 37 °C aufgezeichnet... 19
- Abb. 13: Wachstum der Stämme SA15 (blau) und SA16 (grau). Durch ein automatisches Wachstumsmonitoring System (Bioscreen C) wurde das Wachstum der *S. aureus* Stämme für 72 h aufgezeichnet. Das Medium ist eine Zusammensetzung des Basismediums RPMI und dem Zusatz von Laktose. 20
- Abb. 14: Wachstum der Stämme SA15 (blau) und SA16 (grau). Mittels automatischem Wachstumsmonitoring Systems (Bioscreen C) wurde das Wachstum der *S. aureus* Stämme für 72 h aufgezeichnet. Das Medium setzt sich aus dem Basismedium RPMI und dem Zusatz von Casein zusammen. .... 20
- Abb. 15: Wachstum der Stämme SA15 (blau) und SA16 (grau). Mittels eines automatischen Wachstumsmonitoring Systems (Bioscreen C) wurde das Wachstum der *S. aureus* Stämme für 72 h aufgezeichnet. Das Medium besteht aus dem Basismedium RPMI und den beiden Zusätzen Laktose und Casein. .... 21

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1 .....	10
Tab. 2 .....	10

## Literaturverzeichnis

- Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., & Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, *12*(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0905-3>
- Bardiau, M., Caplin, J., Detilleux, J., Graber, H., Moroni, P., Taminiau, B., & Mainil, J. G. (2016). Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Veterinary Microbiology*, *185*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.01.003>
- Boss, R., Cosandey, A., Luini, M., Artursson, K., Bardiau, M., Breitenwieser, F., Hehenberger, E., Lam, T., Mansfeld, M., Michel, A., Mösslacher, G., Naskova, J., Nelson, S., Podpečan, O., Raemy, A., Ryan, E., Salat, O., Zangerl, P., Steiner, A., & Graber, H. U. (2016). Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. *Journal of Dairy Science*, *99*(1), 515–528. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9589>
- Burnside, K., Lembo, A., de Los Reyes, M., Iliuk, A., Binhtran, N.-T., Connelly, J. E., Lin, W.-J., Schmidt, B. Z., Richardson, A. R., Fang, F. C., Tao, W. A., & Rajagopal, L. (2010). Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. *PloS One*, *5*(6), e11071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011071>
- Fagundes, H., Barchesi, L., Filho, A. N., Ferreira, L. M., & Oliveira, C. A. F. (2010). Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, *41*(2), 376–380. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220100002000018>
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., & Spratt, B. G. (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*, *186*(5), 1518–1530. <https://doi.org/10.1128/jb.186.5.1518-1530.2004>

- Grundmann, H., Aanensen, D. M., van den Wijngaard, C. C., Spratt, B. G., Harmsen, D., & Friedrich, A. W. (2010). Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Medicine*, 7(1), e1000215. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000215>
- Grunert, T., Stessl, B., Wolf, F., Sordelli, D. O., Buzzola, F. R., & Ehling-Schulz, M. (2018). Distinct phenotypic traits of *Staphylococcus aureus* are associated with persistent, contagious bovine intramammary infections. *Scientific Reports*, 8(1), 15968. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34371-1>
- Guinane, C. M., Ben Zakour, N. L., Tormo-Mas, M. A., Weinert, L. A., Lowder, B. V., Cartwright, R. A., Smyth, D. S., Smyth, C. J., Lindsay, J. A., Gould, K. A., Witney, A., Hinds, J., Bollback, J. P., Rambaut, A., Penadés, J. R., & Fitzgerald, J. R. (2010). Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biology and Evolution*, 2, 454–466. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq031>
- Honeyman AL, Friedman H, Bendinelli M. 2002. *Staphylococcus aureus* Infection and Disease, Infectious Agents and Pathogenesis. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers, 6-117.
- Le Maréchal, C., Seyffert, N., Jardin, J., Hernandez, D., Jan, G., Rault, L., Azevedo, V., François, P., Schrenzel, J., van de Guchte, M., Even, S., Berkova, N., Thiéry, R., Fitzgerald, J. R., Vautor, E., & Le Loir, Y. (2011). Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PloS One*, 6(11), e27354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027354>
- Madigan 1949-, M. T., & Brock 1926- [Begründer des Werks], T. D. (2012). Brock Biology of microorganisms. In *Biology of microorganisms* (13. ed., global ed., Issue ISBN: 9780321735515). Boston, Mass. [u.a.]: Pearson / Benjamin Cummings. <https://permalink.obvsg.at/UVW/AC08600765>
- Myles, I. A., & Datta, S. K. (2012). *Staphylococcus aureus*: an introduction. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 34, Issue 2, pp. 181–184). <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0301-9>

- O’Gara, J. P. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 270(2), 179–188. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>
- Olive, A. J., & Sasseti, C. M. (2016). Metabolic crosstalk between host and pathogen: sensing, adapting and competing. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(4), 221–234. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.12>
- Paape, M. J., Wergin, W. P., Guidry, A. J., & Pearson, R. E. (1979). Leukocytes--second line of defense against invading mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 62(1), 135–153. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83215-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83215-4)
- PubMLST. <https://pubmlst.org/general.shtml> (Zugriff 16.06.2020)
- Richardson, E. J., Bacigalupe, R., Harrison, E. M., Weinert, L. A., Lycett, S., Vrieling, M., Robb, K., Hoskisson, P. A., Holden, M. T. G., Feil, E. J., Paterson, G. K., Tong, S. Y. C., Shittu, A., van Wamel, W., Aanensen, D. M., Parkhill, J., Peacock, S. J., Corander, J., Holmes, M., & Fitzgerald, J. R. (2018). Gene exchange drives the ecological success of a multi-host bacterial pathogen. *Nature Ecology & Evolution*, 2(9), 1468–1478. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0617-0>
- Schmid, D., Fretz, R., Winter, P., Mann, M., Höger, G., Stöger, A., Ruppitsch, W., Ladstätter, J., Mayer, N., de Martin, A., & Allerberger, F. (2009). Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 121(3–4), 125–131. <https://doi.org/10.1007/s00508-008-1132-0>
- Sharer, M. V, Su, C., Hegde, N. V, Jayarao, B. M., & Sordillo, L. M. (2003). Differential expression of the lactose transporter gene affects growth of *Staphylococcus aureus* in milk. *Journal of Dairy Science*, 86(7), 2373–2381. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73831-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73831-4)
- Somerville GA, Hrsg. 2016. *Staphylococcus*, Genetics and Physiology. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 1-156.

Thermo Fisher Scientific Inc.

[http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=LP0031&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=LP0031&c=UK&lang=EN) (Zugriff 10.07.2020)

trillium diagnostik. <https://www.trillium.de/zeitschriften/trillium-diagnostik/archiv/ausgaben-2015/td-42015/mikrobiologie.html> (Zugriff 29.06.2020)

Tuchscher, L., Löffler, B., Buzzola, F. R., & Sordelli, D. O. (2010). *Staphylococcus aureus* adaptation to the host and persistence: role of loss of capsular polysaccharide expression. *Future Microbiology*, 5(12), 1823–1832. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.147>

Wilson BA, Winkler ME, Ho BT. 2019. Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach. Fourth Edition. Washington, DC: ASM Press, 516-521.

Winter P, Hrsg. 2009. Praktischer Leitfaden Mastitis, Vorgehen beim Einzeltier und im Bestand. Stuttgart, Germany: Parey, 4-234.

# ANHANG

## A1 Liste aller Stämme

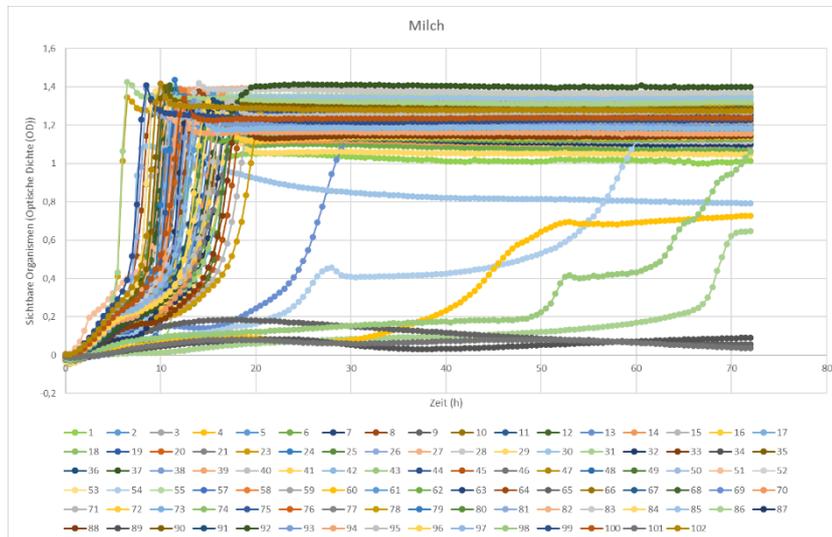
SET	STAMM	ZUORDNUNG	UNTERSUCHT IN FOLGENDEN MEDIEN		
	1	CC705	Skim-Milch		
	2	CC97	Skim-Milch		
	3	CC9	Skim-Milch		
	4	CC20	Skim-Milch		
	5	CC8	Skim-Milch	RPMI-CS	RPMI-CS+L
	6	CC97	Skim-Milch		RPMI-L
	7	CC8	Skim-Milch	RPMI-CS	RPMI-CS+L
	8	CC8	Skim-Milch	RPMI-CS	RPMI-CS+L
	9	CC20	Skim-Milch		
	10	CC8	Skim-Milch		
	11	CC97	Skim-Milch		
	12	CC705	Skim-Milch		
	13	CC97	Skim-Milch		
	14	CC97	Skim-Milch		
	15	CC705	Skim-Milch		
	16	CC705	Skim-Milch		
	17	CC97	Skim-Milch		
	18	CC8	Skim-Milch		
	19	CC9	Skim-Milch		
	20	CC97	Skim-Milch		
	21	CC705	Skim-Milch		
	23	CC705	Skim-Milch		
	24	CC97	Skim-Milch		
	25	CC97	Skim-Milch		
	26	CC8	Skim-Milch		
	27	CC8	Skim-Milch		
	28	CC20	Skim-Milch		
	29	CC97	Skim-Milch		
	30	CC97	Skim-Milch		
	31	CC5	Skim-Milch		
	32	CC97	Skim-Milch		
	33	CC705	Skim-Milch		
	34	CC97	Skim-Milch		
	35	CC9	Skim-Milch		
	36	CC705	Skim-Milch		
	37	CC8	Skim-Milch		
	38	CC705	Skim-Milch		
	39	CC8	Skim-Milch		
	40	CC97	Skim-Milch		
	41	CC8	Skim-Milch		
	42	CC9	Skim-Milch		
	43	CC97	Skim-Milch		
	44	CC97	Skim-Milch		
	45	CC97	Skim-Milch		
	46	CC705	Skim-Milch		
	47	CC9	Skim-Milch		
	48	CC705	Skim-Milch		
	49	CC705	Skim-Milch		
	50	CC97	Skim-Milch		
	51	CC97	Skim-Milch		
	52	CC97	Skim-Milch		
	53	CC97	Skim-Milch		
	54	CC9	Skim-Milch		
	55	CC8	Skim-Milch		
	57	CC705	Skim-Milch		
	58	CC705	Skim-Milch		
	59	CC97	Skim-Milch		
	60	CC9	Skim-Milch		
	61	CC8	Skim-Milch		
	62	CC97	Skim-Milch		
	63	CC97	Skim-Milch		
	64	CC8	Skim-Milch		
	65	CC705	Skim-Milch		
	66	CC20	Skim-Milch		
	67	CC705	Skim-Milch		
	68	CC705	Skim-Milch		
	69	CC20	Skim-Milch		
	70	CC705	Skim-Milch		
	71	CC97	Skim-Milch		
	72	CC97	Skim-Milch		
	73	CC97	Skim-Milch		
	74	CC8	Skim-Milch		
	75	CC9	Skim-Milch		
	76	CC97	Skim-Milch		
	77	CC97	Skim-Milch		
	78	CC97	Skim-Milch		
	79	CC8	Skim-Milch		
	80	CC97	Skim-Milch		
	81	CC705	Skim-Milch		
	82	CC705	Skim-Milch		
	83	CC8	Skim-Milch		
	84	CC97	Skim-Milch		
	85	CC9	Skim-Milch		
	86	CC705	Skim-Milch		
	87	CC20	Skim-Milch		
	88	CC705	Skim-Milch		
	89	CC97	Skim-Milch		
	90	CC8	Skim-Milch		
	91	CC705	Skim-Milch		
	92	CC8	Skim-Milch		
	93	CC705	Skim-Milch		
	94	CC97	Skim-Milch		
	95	CC8	Skim-Milch		
	96	CC705	Skim-Milch		
	97	CC97	Skim-Milch		
	98	ST152	Skim-Milch		
	99	CC97	Skim-Milch		
	100	CC8	Skim-Milch		
	101	CC9	Skim-Milch		
	102	CC8	Skim-Milch	RPMI-CS	RPMI-CS+L
					RPMI-L

BOV

Human	SA01	CC8	Skim-Milk	RPMI-CS	RPMI-CS+L	RPMI-L
	SA02	CC8	Skim-Milk			
	SA03	CC8	Skim-Milk			
	SA04	CC8	Skim-Milk			
	SA05	CC8	Skim-Milk			
	SA06	CC30	Skim-Milk			
	SA07	CC30	Skim-Milk			
	SA08	CC30	Skim-Milk			
	SA09	CC5	Skim-Milk			
	SA10	CC5	Skim-Milk			
	SA11	CC5	Skim-Milk			
	SA12	CC45	Skim-Milk			
	SA13	CC45	Skim-Milk			
	SA14	CC45	Skim-Milk			

## A2 Milch

### A2.1 Wachstumskurven aller bovinen Stämme in Milch



### A2.2 Wachstumskurven der humanen Stämme in Milch

