

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor : Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. A.S. Kekulé



Isolierung und Charakterisierung von *Fusobacterium varium*-Phagen aus Abwasserproben

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Von Fabian Otto
geboren am 04.04.1973 in Halle/Saale

Betreuer: Prof. Dr. med. habil. C. Höhne

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. habil. C. Höhne, Institut für Medizinische Mikrobiologie der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. med. habil. A.C. Rodloff, Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Infektionsepidemiologie der Universität Leipzig
3. PD Dr. med. habil R. Fischer, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

verteidigt am 13.08.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000003759

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003759>]

Bakteriophagen mit Spezifität für obligat anaerobe gramnegative Stäbchen sind bisher in nennenswerter Zahl für mehrere Spezies des Genus *Bacteroides* beschrieben worden, dagegen aber nur in sehr geringer Zahl solche für zwei Spezies des Genus *Fusobacterium*, nämlich 7 für *Fusobacterium varium* und 1 für *Fusobacterium necrophorum*. In der vorliegenden Arbeit wird über die Isolierung von weiteren 9 chloroformresistenten DNS-Phagen mit ausschließlicher Spezifität für Stämme der Spezies *Fusobacterium varium* aus zwei verschiedenen Abwasserproben und deren eingehende Charakterisierung berichtet. Phagen für Stämme der Spezies *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium mortiferum* und *Fusobacterium gonidiaformans* sowie für nicht auf Speziesebene identifizierbare Fusobakterien konnten nicht nachgewiesen werden.

Die Charakterisierung umfaßte neben dem Verhalten gegenüber Chloroform die Bestimmung der Ultrastruktur, der Plaquemorphologie, der lytischen Aktivität gegenüber einer größeren Zahl von Stämmen der Genera *Fusobacterium* und *Bacteroides*, sowie die molekularbiologischen Untersuchungen der Strukturproteine und des Phagengenoms. Mit Ausnahme von zwei als identisch bestimmten Phagen zeigten die verbleibenden 8 Isolate in mindestens einem Merkmal eindeutige Unterschiede untereinander und gegenüber den von BÖHME beschriebenen Phagen mit gleicher Speziespezifität und stellten somit eigene Entitäten dar. Im Einzelfall sind aber evolutionäre verwandschaftliche Beziehungen innerhalb eines Morphotyps wahrscheinlich. Erstmals konnten 2 Phagen mit Spezifität für *Fusobacterium varium* isoliert werden, die mit einem isometrischen Kopf und einem langen, mit einer dicken Scheide versehenen und daher wahrscheinlich auch kontraktile Schwanz dem Morphotyp der *Myoviridae* zuzuordnen sind. Für jeweils 3 Isolate ergab sich deren Zugehörigkeit zu den bereits für Phagen dieser Spezies bekannten Morphotypen der *Podoviridae* bzw. *Siphoviridae*. Alle Phagen lysierten sowohl die indolpositiven als auch indolnegativen Stämme der insgesamt 21 untersuchten Isolate von *Fusobacterium varium*, woraus wegen der ermittelten hohen Speziespezifität gefolgert werden kann, daß die Eigenschaft der Indolbildung keine einheitliche Eigenschaft von *F. varium* ist. Andererseits eröffnet sich hierdurch die Möglichkeit der Etablierung eines Transduktionssystems innerhalb der Spezies *F. varium* mit der Indolbildung als kontraselektivem Marker zwischen indolpositiven und indolnegativen Stämmen. Da die Phagen fv Na 5 (E) und fv 83-554/3/3 (G) zusammen alle 21 Stämme von *F. varium* lysierten, ergibt sich die Möglichkeit, diese Phagen zur Speziesidentifizierung einzusetzen. Schließlich soll hervorgehoben werden, daß der Stamm *F. varium* MLU 91-2641/1 von allen Phagen lysiert wurde. Er könnte somit als ein universeller Indikator für *F. varium*-Phagen dienen, z.B. zur Erkennung viraler fäkaler Kontamination in Wasserproben.

Otto, Fabian: Isolierung und Charakterisierung von *Fusobacterium varium*-Phagen aus Abwasserproben. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 73 Seiten, 2001

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	MATERIALIEN	8
2.1	Bakterienstämme	8
2.2	Nährmedien und Zusätze	10
2.2.1	Flüssige Medien	10
2.2.2	Feste Medien	11
2.2.3	Zusätze	12
2.3	Puffer und Lösungen für die molekularbiologischen Untersuchungen.....	12
2.3.1	Materialien für die Proteinanalyse	12
2.3.2	Materialien für die DNS-Analyse	14
3	METHODEN	16
3.1	Anaerobioseverfahren.....	16
3.1.1	Flüssigkulturen in BHI-Bouillon	16
3.1.2	AnaeroGen-Topfsystem.....	16
3.2	Methoden zur Isolierung, Charakterisierung und Anreicherung der Phagen	17
3.2.1	Isolation von <i>Fusobacterium</i> -Phagen aus Abwasser.....	17
3.2.1.1	Spotttest	17
3.2.1.2	Overlay.....	17
3.2.2	Bestimmung der Phagenkonzentration	18
3.2.3	Klonierung der Phagen.....	18
3.2.4	Anreicherungstechniken	19
3.2.5	Langfristige Aufbewahrung der Phagenlysate.....	19
3.2.6	Bestimmung des Lysisspektrums	20
3.2.7	Versuche zur Chloroformresistenz	20
3.2.8	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	20
3.3	Methoden zur DNS-Analyse	21
3.3.1	Präparation der Phagen-DNS	21
3.3.2	Restriktionsanalyse der DNS	22
3.3.3	Agarose-Gel-Elektrophorese der Restriktionsansätze	22
3.4	Methoden zur Proteinanalyse	23
3.4.1	Extraktion der Phagenproteine	23
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	23
3.4.3	Färbung der SDS-Polyacrylamidgele	24
4	ERGEBNISSE.....	24
4.1	Isolierung und Vermehrung der Phagen	24
4.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	27

4.3	Plaquemorphologie	33
4.4	Chloroformresistenz	36
4.5	Lysisspektrum	37
4.6	DNS-Analysen	39
4.7	Analyse der Strukturproteine.....	44
5	DISKUSSION.....	49
5.1	Phagenmorphologie	50
5.2	Phagenstabilität und Chloroformresistenz	51
5.3	Plaquemorphologie	52
5.4	Lysisspektrum	54
5.5	Phagen als Indikatoren viraler Abwasserbelastung.....	55
5.6	Restriktionsanalyse des Phagengenoms.....	57
5.7	Analyse der Phagenproteine	59
5.8	Weitere Aspekte.....	60
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	61
7	LITERATURVERZEICHNIS	64
8	THESEN	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung Nr.	Beschreibung
1	Morphotypen der Bakteriophagen
2	Elektronenoptische Aufnahme der Phagen fv 8501/2 (A) und fv 81-531/2/3 (F), beide gehören morphologisch zu den <i>Myoviridae</i> .
3	Elektronenoptische Aufnahme der Phagen fv 81-531/2/2 (B), fv 8501/3 (D) und fv 83-680/3 (H), alle gehören morphologisch zu den <i>Siphoviridae</i> .
4	Elektronenoptische Aufnahme der Phagen fv 83-554/3/2 (C), fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G), alle gehören morphologisch zu den <i>Podoviridae</i> . Der schwarze Pfeil markiert den Schwanz (Phage E).
5	Elektronenoptische Aufnahme des Phagen fv 83-554/3/4 (I), morphologisch zu den <i>Podoviridae</i> gehörend. Auch in allen anderen Charakterisierungsmerkmalen zeigte sich dieser Phage mit fv 83-554/3/3 (G) identisch.
6	Elektronenoptische Darstellung des Phagen fv 8501/2 (A) mit Detailbezeichnung
7	Elektronenoptische Darstellung des Phagen fv 81-531/2/3 (F) mit Detailbezeichnung
8	Plaquemorphologie der <i>Myoviridae</i> fv 8501/2 (A) und fv 81-531/2/3 (F)
9	Plaquemorphologie der <i>Podoviridae</i> . In der oberen Reihe sind fv 83-554/3/2 (C) und fv Na5 (E), in der unteren Reihe sind fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) dargestellt
10	Plaquemorphologie der <i>Siphoviridae</i> fv 81-531/2/2 (B), fv 8501/3 (D) und fv 83-680/3 (H)
11	Bandenmuster der Bakteriophagen-DNS nach Restriktion mit <i>Eco</i> R1 und <i>Hind</i> III (nach Auftrennung im 1% Agarose-Gel), Größenangaben in bp
12	Bandenmuster der Bakteriophagen-DNS nach Restriktion mit <i>Hinf</i> I nach Auftrennung im 1% Agarose-Gel, Größenangaben in bp
13	Darstellung der Strukturproteine der Phagen im 12% reduzierenden SDS-Gel

Tabellenverzeichnis

Tabelle Nr.	Beschreibung
1	Einteilung der Phagenfamilien und –genera
2	Zur Phagenisolierung verwendete Bakterienstämme, in der letzten Spalte ist jeweils die für die Isolierung verwendete Abwasserprobe angegeben
3	Zur Testung der Lysisspektren zusätzlich verwendete Bakterienstämme
4	Zur DNS-Analyse verwendete Restriktionsendonukleasen mit Angabe der Erkennungssequenzen (die Pfeile markieren die Schnittstellen)
5	Phagen mit Spezifität für <i>Fusobacterium varium</i> bzw. <i>Bacteroides fragilis</i> , die aus 2 Abwasserproben der Kläranlage Nord in Halle isoliert wurden (Lfd. Nr.1-10). Außerdem wurden die von BÖHME (16) isolierten Phagen mit aufgeführt (Lfd. Nr. 11-15)
6	Phagentiter, die während der Klonierungsversuche mit den Einzelplaqueanreicherungen erzielt wurden. Die Angaben erfolgten in pfu/ml Phagenlysat.
7	Vergleich der strukturellen Merkmale der isolierten <i>Fusobacterium varium</i> -Phagen mit Größenangaben in Nanometern
8	Plaquemorphologische Details der isolierten Phagen mit Spezifität für Stämme der Spezies <i>Fusobacterium varium</i> (Durchmesserangaben in mm)
9	Ergebnisse der Bestimmung der Lysisspektren von <i>F. varium</i> -Phagen (einfache RTD) mit den für die Isolierung der Phagen benutzten Wirtsstämmen unter Berücksichtigung der Zuordnung zum Morphotyp
10	Ergebnisse der Bestimmung der Lysisspektren von <i>F. varium</i> -Phagen (1000fache RTD) mit indolpositiven und indolnegativen Stämmen von <i>F. varium</i> unter Berücksichtigung der Zuordnung zum Morphotyp
11	Erkennbare Einzelbanden nach Restriktion der Phage-DNS mit <i>Hinf</i> I
12	Erkennbare Einzelbanden nach Restriktion der Phagen-DNS mit <i>Sau</i> 3AI
13	Ergebnisse der Restriktionsanalyse der Phagen-DNS mit <i>Eco</i> RI – Darstellung der Banden mit Unterteilung gemäß Morphotyp, Größenangaben in Basenpaaren (bp) mit Summenangabe
14	Ergebnisse der Restriktionsanalyse der Phagen-DNS mit <i>Hind</i> III – Darstellung der Banden mit Unterteilung gemäß Morphotyp, Größenangaben in Basenpaaren (bp) mit Summenangabe

- 15 Ergebnisse der SDS-PAGE der Phagenproteine – Darstellung der Banden in Haupt- (zur Verdeutlichung fettgedruckt) und Nebenbanden mit Unterteilung gemäß Morphotyp, Größenangaben in kDa, vergleichbare Größen wurden auf eine Zeile gesetzt
- 16 Vergleich der übereinstimmenden bzw. differierenden Merkmale der *Podoviridae* einschließlich der bereits von BÖHME (16) und HÖHNE et al. (44) beschriebenen Phagen L und M. Beim Auftreten gemeinsamer Merkmale zwischen einzelnen Phagen wurde dies durch große Buchstaben ausgedrückt, bei fehlenden Gemeinsamkeiten durch kleine Schreibweise.
- 17 Vergleich der übereinstimmenden bzw. differierenden Merkmale der *Siphoviridae* einschließlich der bereits von BÖHME (16) und HÖHNE et al. (44) beschriebenen Phagen K, N und O. Beim Auftreten gemeinsamer Merkmale zwischen einzelnen Phagen wurde dies durch große Buchstaben ausgedrückt, bei fehlenden Gemeinsamkeiten durch kleine Schreibweise.
- 18 Vergleich der übereinstimmenden bzw. differierenden Merkmale der *Myoviridae*. Beim Auftreten gemeinsamer Merkmale zwischen einzelnen Phagen wurde dies durch große Buchstaben ausgedrückt, bei fehlenden Gemeinsamkeiten durch kleine Schreibweise.

Abkürzungsverzeichnis

Bakterienstammsammlungen

ATCC	American Type Culture Collection (USA)
DSM	Deutsche Stammsammlung Mikroorganismen (Deutschland)
HSP	Microbiology Service at the Hospital de Sant Paul (Spanien)
MLU	Institut für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Deutschland)
NCTC	National Collection of Type Cultures (UK)
RMA	Research Alden Laboratory, Santa Monica (USA)
VPI	Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia (USA)

Techniken und Substanzen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BA	Bouillonanreicherung
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	base pairs/Basenpaare
cl	confluent lysis/konfluente Lysis
ds	double-stranded/doppelsträngig
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPA	Einzelplaquanreicherung
kb	kilo base pairs/Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
OA	Originalabwasser
OL	overlay
OR	Originalanreicherung
onc	over night culture/Übernachtkultur
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol

VII

pfu	plaque forming units/plaquebildende Einheiten
RNS	Ribonukleinsäure
RTD	Routine Test Dilution
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SM	Sodiumchloride-MgSO ₄ -Puffer
ss	single-stranded/einzelsträngig
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethylethylendiamin
TM	Tris-MgSO ₄ -Puffer
TMV	Tobacco Mosaic Virus
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan

1 Einleitung

Bakteriophagen sind Viren von Bakterien, wobei zwischen Phagen und Wirtszelle eine oft bis auf die Stammebene reichende Spezifität besteht.

Die ersten intensiveren Untersuchungen über Auflösungserscheinungen von Bakterien durch Phagen gehen auf den kanadischen Forscher FELIX d' HERELLE 1917 (39) zurück. Bereits 1915 hatte TWORT (75) Zerfallsvorgänge bei Staphylokokken durch Phagenwirkung beschrieben, seiner Veröffentlichung wurde jedoch keine Beachtung geschenkt. Nachdem er vorher bereits in einer Reihe von Veröffentlichungen über Phagen berichtet hatte, veröffentlichte d'HERELLE im Jahre 1921 sein Buch mit dem Titel „Le bactériophage: son rôle dans l'immunité“. Seit d'HERELLES Entdeckung wurden in der Folge von vielen Autoren Bakteriophagen in Darmausscheidungen erkrankter und gesunder Menschen oder Tiere, aber auch in der freien Natur wie z.B. in Abwässern, nachgewiesen. Die Annahme d'HERELLES, daß es nur eine einzige Bakteriophagenart gäbe, wurde erst später widerlegt.

Zumeist bestehen Bakteriophagen wie andere Viren aus einer Proteinhülle (Kapsid), welche aus Kapsomeren aufgebaut ist. Das Kapsid umhüllt das Phagengenom (*core*), das entweder aus RNS oder aus DNS bestehen kann. Beide Nukleinsäurearten können dabei als Einzel- oder Doppelstrang vorliegen und sind verantwortlich für die Replikation des Phagengenoms sowie die Synthese der Strukturproteine. Daneben gibt es Bakteriophagen, die neben Proteinen auch Lipoproteine enthalten oder im Falle der Plasmaviridae statt des Kapsides lediglich eine Virushülle aus Lipoproteinen haben. Bakteriophagen sind obligate Zellparasiten, sie besitzen keine energieliefernden Enzymsysteme (20).

Eine Klassifikation bekannter Bakteriophagen wurde 1967 von BRADLEY (18) aufgestellt. Diese sah eine Aufteilung der Phagen in sechs morphologische Grundtypen (A-F) vor. Die Typen A-C sind gemäß dieser Einteilung geschwänzte Phagen mit doppelsträngiger DNS. Der Schwanz ist beim Typ A kontraktile, bei den Typen B und C dagegen nicht. Typ C weist im Unterschied zu Typ A nur einen kurzen Schwanz auf. Der Typ D umfasst schwanzlose Phagen mit isometrischem Kopf, der aus großen Kapsomeren besteht und Einzelstrang-DNS enthält. Der ebenfalls schwanzlose, isometrische Phage vom Typ E besitzt dagegen ein aus kleinen Kapsomeren aufgebautes Kapsid und eine Einzelstrang-RNS als Nukleinsäure. Der letzte Typ F besteht aus flexiblen Filamenten. Das Genom liegt hier als Einzelstrang-DNS vor.

Gegenwärtig am meisten anerkannt ist die überarbeitete Einteilung der Bakteriophagen nach ACKERMANN (2), die neu entdeckte Phagentypen genauso berücksichtigt wie die variable Kopfgröße bei geschwänzten Phagen. Diese neue Klassifizierung sieht eine Unterteilung in 13

verschiedene Familien und Genera vor, die teilweise mit der Einteilung von BRADLEY übereinstimmt. Die wichtigsten Eigenschaften sind in Abbildung 1 und Tabelle 1 zusammengestellt.

Geschwänzte Phagen werden gemäß dieser Klassifikation zur Ordnung der *Caudovirales* zusammengefaßt und in die Familien *Myoviridae* (Schwanz dick und lang, kontraktile, entspricht Typ A nach BRADLEY), *Siphoviridae* (langer, nicht kontraktile Schwanz, Typ B nach BRADLEY) und *Podoviridae* (kurzer, nicht kontraktile Schwanz, Typ C nach BRADLEY) unterteilt. Die Untertypen A1-3, B1-3 und C1-3 resultieren aus unterschiedlichen Kopflängen der geschwänzten Phagen, was jedoch ein weniger wichtiges Merkmal für die Taxonomie darstellt. Den Typen D und E nach BRADLEY entsprechen die isometrischen Phagen mit 5 Familien und 9 Gattungen, so z.B. die *Microviridae* und *Leviviridae*. Eine sehr bemerkenswerte Form weisen die filamentösen (3 Familien, 4 Gattungen, F1-4) und pleomorphen Phagen (2 Familien und Genera, G1-2) auf.

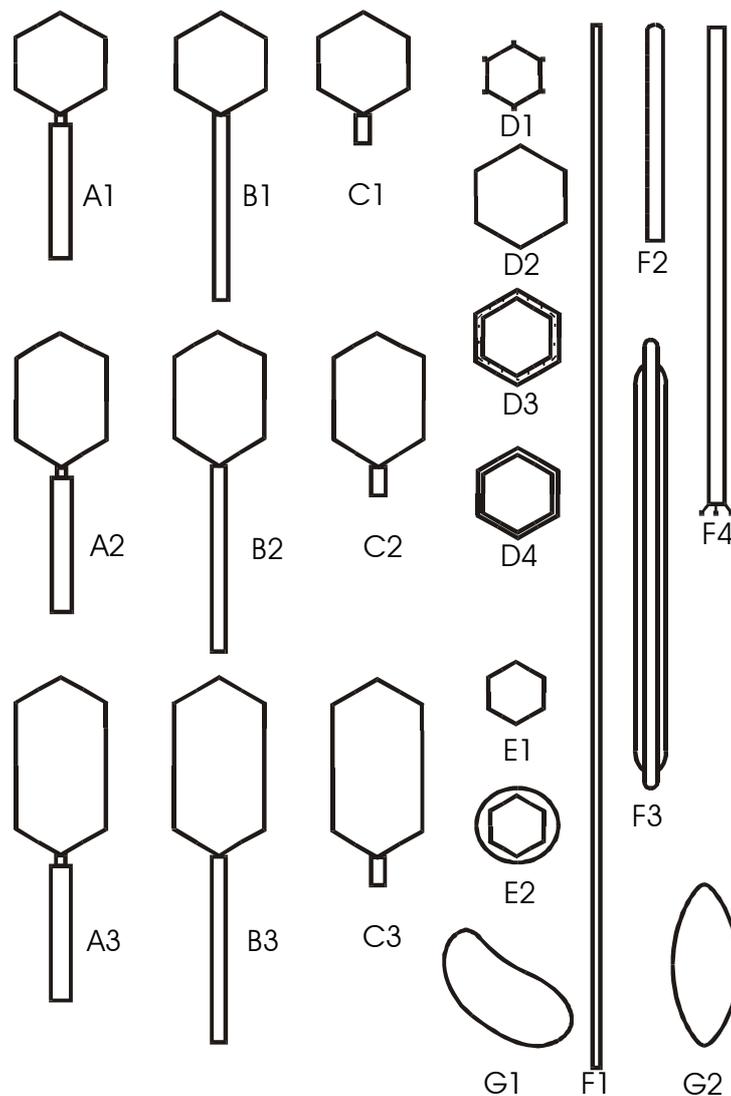


Abb. 1: Morphotypen der Bakteriophagen. Nach ACKERMANN (2, 5, 6)

Tabelle 1: Einteilung der Phagenfamilien und -genera. Nach ACKERMANN (2)

Morphotyp	Form	Genom	Familie	Genus	Einzelheiten
A1 bis A3	geschwänzt	DNS, ds, l	<i>Myoviridae</i>	--	Schwanz kontraktil
B1 bis B3		DNS, ds, l	<i>Siphoviridae</i>	--	Schwanz lang nicht kontraktil
C1 bis C3		DNS, ds, l	<i>Podoviridae</i>	--	Schwanz kurz
D1	isometrisch	DNS, ss, z	<i>Microviridae</i>	Microvirus Spiromicrovirus Bdellomicrovirus Chlamydia-micro- virus	Auffällige Kapsomere
D3		DNS, ds, z, S	<i>Corticoviridae</i>	Corticovirus	Kapsid komplex, Lipide
D4		DNS, ds, l	<i>Tectiviridae</i>	Tectivirus	Kapsid doppelt, Pseudoschwanz Lipide
E1		RNS, ss, l	<i>Leviviridae</i>	Levivirus Allolevivirus	
E2		RNS, ds, l, seg.	<i>Cystoviridae</i>	Cystovirus	Hülle, Lipide
F1	filamentös	DNS, ss, z	<i>Inoviridae</i>	Inovirus	Lange Filamente
F2		DNS, ss, z		Plectrovirus	Kurzer Stab
F3		DNS, ds, l	<i>Lipothrixviridae</i>	Lipothrixvirus	Hülle, Lipide
F4		DNS, ds, l	<i>Rudiviridae</i>	Rudivirus	TMV-ähnlich
G1	pleomorph	DNS, ds, z, S	<i>Plasmaviridae</i>	Plasmavirus	Hülle, Lipide kein Kapsid
G2		DNS, ds, z, S	<i>Fuselloviridae</i>	Fusellovirus	Zitronenform

z = zirkulär

l = linear

S = Superhelix

seg. = segmentiert

Bakteriophagen stellen die größte aller Gruppen unter den Viren dar und kommen sowohl in Eubakterien als auch in Archaeobakterien vor, entweder als Prophagen in lysogenen Wirtsstämmen oder frei in der Natur innerhalb einer weiten Spanne von Habitaten.

Die ersten elektronenoptischen Untersuchungen von Phagen erfolgten durch H. RUSKA im Jahr 1940. Seit 1959 sind mittlerweile ungefähr 5100 Bakteriophagen bekannt geworden, wovon die geschwänzten Phagen mit etwa 96% (ca. 4950 Phagen) die größte Gruppe darstellen. Innerhalb derselben gehören etwa 60,8% zu den *Siphoviridae*, 14,1% zu den *Podoviridae* und 25,1% zu den *Myoviridae*. Nur etwa 3,6% aller bekannten Bakteriophagen sind kubisch, filamentös oder pleomorph (2).

Der Prozeß der Phagenvermehrung läuft in mehreren Schritten ab. Die erste Phase, die Adsorption an die Wirtszelle, stellt eine spezifische Wechselwirkung zwischen viralen Proteinen und bakteriellen Rezeptoren dar. Geschwänzte Phagen adsorbieren mit dem distalen Schwanzende, schwanzlose Phagen heften sich mit Hilfe eines Hüllproteins an. Als Rezeptoren der Bakterienzelle können neben Proteinen und Polysacchariden auch Pili oder Flagellen dienen. Aus der spezifischen Wechselwirkung zwischen Phage und Rezeptor erklärt sich die hohe Wirtsspezifität. Bakterien ohne entsprechende Rezeptoren sind somit gegen Bakteriophagen resistent (18).

Nach erfolgter Adsorption penetriert nur die Nukleinsäure des Phagen in die Wirtszelle, während die Proteinhülle ausserhalb der Zelle verbleibt, die Nukleinsäure wird gewissermaßen in das Bakterium injiziert. Die nächste Phase umfasst den vom Virusgenom vorgegebenen Vermehrungszyklus in der Wirtszelle. Dabei sind zwischen virulenten und temperenten Phagen Unterschiede festzustellen. Bei virulenten Phagen erfolgt ein Arrest der wirtseigenen DNS/RNS- und Proteinsynthese. Statt dessen kommt es zur Replikation der viralen Nukleinsäuren und Translation der Phagenproteine, gefolgt von Zusammenbau und Freisetzung der neuen Bakteriophagen parallel zur Lyse der Zelle, die dabei zugrunde geht. Je nach Phagenart und Stamm sowie den physiologischen Wachstumsbedingungen dauert ein Reproduktionszyklus etwa 20-60 Minuten. Aus einer infizierten Bakterienzelle werden zwischen 20 und mehreren hundert Phagen freigesetzt, was als *burst size* (Wurfgröße) bezeichnet wird. Die Periode von der Infektion bis zum Auftreten des ersten reifen Phagen heißt Eklipse (20).

Bei temperenten Phagen wird das Phagen-genom in das Wirtsgenom integriert und mit diesem repliziert, ohne daß primär neue Phagenpartikel entstehen. Das integrierte Phagen-genom wird als Prophage bezeichnet, der abhängig von verschiedenen induzierenden Faktoren (z.B. UV-Licht) oder spontan in das virulente Stadium zurückkehren kann. Der zum Prophagenstadium führende Vorgang heisst Lysogenisation, der betroffene Bakterienstamm lysogen. Prophagen können bestimmte Leistungen oder Eigenschaften des betroffenen lysogenen Bakterienstammes

verändern. Wenn virale, in das Bakteriengenom integrierte Gene exprimiert werden, und keine virale, sondern eine bakterielle Funktion ausüben, spricht man von einer lysogenen Konversion. Ein bekanntes Beispiel ist die Toxinbildung bei Diphtheriebakterien, die auf der Wirkung eines Prophagen beruht. (7, 18, 20)

Im Bereich der Bakteriengenetik kommt der sogenannten Transduktion Bedeutung zu, bei der mit Hilfe eines Bakteriophagen genetisches Material von einer Bakterienzelle auf eine andere übertragen werden kann, was unter anderem für die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen von Bedeutung ist (20).

Seit der Erstbeschreibung der Bakteriophagen gab es Bemühungen, sie therapeutisch bei bestimmten Infektionen einzusetzen. Gerade in den Jahren nach Ihrer Entdeckung (1920 – 1940) wurde eine Vielzahl von Versuchen unternommen, die jedoch nicht den gewünschten Erfolg brachten. Mit der Entwicklung hochwirksamer Antibiotika verlor dieser Anwendungsaspekt weiter an Bedeutung. Heute wird in verschiedenen Zentren noch vereinzelt an therapeutischen Anwendungen geforscht, beispielsweise zum Einsatz staphylokokkenspezifischer Bakteriophagen bei lokalen Infektionen (25). Besonders in den Ländern des ehemaligen Ostblockes wurden Phagen bereits erfolgreich bei der Behandlung eitriger Infektionen eingesetzt (4, 26). Global betrachtet sind die Ergebnisse jedoch, verglichen mit den ursprünglich in den therapeutischen Nutzen gesetzten Hoffnungen, eher enttäuschend.

Neben dem Einsatz in der Genetik werden Phagen heute vor allem zur Lysotypie bei epidemiologischen Studien verwendet, daneben auch zur Differenzierung verschiedener Spezies (20, 33, 35, 38). Dabei stellt für Typisierungsschemata vor allem die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ein wiederkehrendes Problem dar (64).

Außerdem wurden Phagen in verschiedenen Studien als Indikatoren fäkal-oraler/viraler Abwasserbelastung z.B. als Indikatoren für Enterovirus-Vorkommen in Wasserproben untersucht (12). Zusätzlich können Phagen als Modelle für das Verhalten von Enteroviren in Abwasserbehandlungsprozessen wie z.B. Desinfektion, Filtration, Koagulation usw. dienen (12). Besonders im Hinblick auf die Kontrolle etablierter Wasserbehandlungsverfahren oder die Formulierung von Qualitätsstandards für Wasser wäre ein zuverlässiger Indikator sehr von Nutzen (59). Idealerweise wäre die Isolation der Viren selbst anzustreben, was jedoch in der Praxis auf verschiedene Probleme wie z.B. zeitlicher Aufwand, Kosten, Variation und Präzision der Detektionsverfahren stößt. Phagen sind hinsichtlich Struktur, Komposition, Morphologie und Größe den Enteroviren ähnlich. Bakteriophagen mit Spezifität für *Bacteroides fragilis*, insbesondere für den Stamm HSP-40, wurden auf ihre mögliche Eigenschaft als Indikatoren von

viralen Verunreinigungen in Trinkwasser bzw. menschlicher fäkaler Wasserverunreinigungen untersucht (72). Diese Phagen haben denselben Ursprung wie humane Enteroviren, zeigen hohe Korrelation mit deren Anwesenheit und vermehren sich nicht signifikant unter natürlichen Umweltbedingungen. Bakterien der Gattung *Bacteroides* sind strikt anaerobe Keime und eine Hauptkomponente menschlicher Faeces. Es ist unwahrscheinlich, daß sie in der Natur frei vorkommen, folglich hätten infizierende Phagen das Potential als Virus-Indikatoren. In der Arbeit von TARTERA und JOFRE (72) konnten aus allen untersuchten Abwasserproben mit *Bacteroides fragilis* HSP-40 als Vermehrungsstamm Phagen isoliert werden, ebenso wie aus 10% der untersuchten menschlichen Faeces, was nach Meinung der Autoren die Anzahl der aus den Abwässern isolierten Phagen hinreichend erklärt. Dagegen war ein Phagennachweis für *Bacteroides fragilis* HSP-40 aus tierischen Faeces nicht erfolgreich. Bei den Untersuchungen konnte auch die bereits erwähnte hohe Speziespezifität wiederum beobachtet werden.

Auch die Verbesserung der Detektionsverfahren für Phagen aus Wasserproben aller Art sowie aus Faeces ist Gegenstand mehrerer Forschungsarbeiten. Dies beinhaltet unter anderem Vergleiche unterschiedlicher Filtrationsverfahren oder Variationen der verwendeten Nährlösungen und der Untersuchungsbedingungen (z.B. pH-Wert) (12, 24, 59, 60, 73).

Bakteriophagen mit Spezifität für anaerobe gramnegative Bakterienspezies waren bislang nur in geringem Umfang Gegenstand von Isolierungsversuchen. Die Suche konzentrierte sich vielmehr auf solche Wirtsbakterien, denen aus medizinischen, wirtschaftlichen oder anderen Gründen besonderes Interesse galt, wie z.B. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Staphylo-* und *Streptokokken* sowie den anaeroben Clostridien. Anaerobier haben jedoch gerade in den letzten Jahren als Erreger von Infektionen an Bedeutung gewonnen (14, 29, 50). Neben den bereits erwähnten *Clostridium-* und *Bacteroides-*Spezies muß auch Vertretern des Genus *Fusobacterium* Beachtung geschenkt werden. Fusobakterien sind wie Vertreter von *Bacteroides spp.* gramnegative, obligate Anaerobier. Nach ihrer ersten Beschreibung im späten 19. Jahrhundert unterlag die Taxonomie vielfältigen Änderungen (14). Aus medizinischer Sicht sind Fusobakterien wichtige Verursacher endogener pyogener Infektionen.

Der erste Phage, der anaerobe gramnegative Stäbchen als Wirtsbakterium besaß, war der für *Sphaerophorus varius* von HUET und THOUVENOT beschriebene Phage 277 (47). Da das Genus *Sphaerophorus* heute dem Genus *Fusobacterium* entspricht, war somit der erste für anaerobe gramnegative Stäbchen entdeckte Phage ein Vertreter mit Spezifität für eine Spezies des Genus *Fusobacterium* und zwar *F. varium*.

SABISTON und COHL (67) isolierten 1969 einen für *Bacteroides* spezifischen Phagen aus Abwässern, gefolgt von Untersuchungen wie z.B. von PREVOT et al. (65), NACESCU et al. (63), BRANDIS et al. (19), KELLER und TRAUB (52), BURT et al. (21), BOOTH et al. (15),

COOPER et al. (23), KORY und BOOTH (55), TARTERA und JOFRE (72) sowie HÖHNE et al. (42).

Für Fusobakterien wurden bisher nur 8 Phagen beschrieben. Ein Phage mit Spezifität für *F. necrophorum* wurde von TAMADA et al. (71) isoliert und ist morphologisch den Myoviren zuzuordnen, während der Phage 277 von *F. varium* (17, 47) zu den Podoviren gehört. ANDREWS et al. beschrieb 1997 ebenfalls einen für *F. varium* spezifischen Phagen (10), und BÖHME isolierte aus Abwasserproben 5 Bakteriophagen von *F. varium* (16), erstmals darunter auch Vertreter der *Siphoviridae* mit dieser Spezifität (44).

Das primäre Ziel der vorliegenden Untersuchungen bestand in der Isolierung und Charakterisierung weiterer Phagen mit Spezifität für einzelne Spezies des Genus *Fusobacterium*, um die insgesamt noch sehr begrenzte Palette der bislang von HUET und THOUVENOT (47), TAMADA et al. (71), ANDREWS et al. (10) sowie BÖHME (16) bzw. HÖHNE et al. (44) beschriebenen Phagen zu erweitern.

Hierzu sollten Abwasserproben städtischer Kläranlagen unter Verwendung einer größeren Zahl von Stämmen verschiedener Spezies des Genus *Fusobacterium* als Vermehrungsstämme auf das Vorkommen von Phagen untersucht werden. Gleichzeitig war dabei der Frage nachzugehen, ob mit bestimmten Stämmen des Genus *Fusobacterium* häufiger Phagen als Hinweis auf virale fäkale Kontamination in Abwasserproben nachweisbar sind, als mit dem von TARTERA und JOFRE (72) als Universalindikator vorgeschlagenen Stamm HSP-40 von *Bacteroides fragilis*.

Die neuen Isolate waren an Hand ihrer biologischen, ultrastrukturellen und molekularbiologischen Merkmale eingehend zu charakterisieren und die Ergebnisse dieser Merkmalsbestimmungen mit denen der Untersuchungen von BÖHME (16) bzw. HÖHNE et al. (44) einer vergleichenden Wertung zu unterziehen. Ziel dieses Teils der Aufgabe war die Beantwortung der Frage, bei welchen Phagen es sich um eigene Entitäten handelt bzw. welche Isolate identische Phagen darstellen.

Ein besonderer Schwerpunkt der Untersuchungen betraf die Suche nach Fusobakterien-Phagen mit bisher bei diesen Bakterienviren noch nicht nachgewiesenen Morphotypen, namentlich solchen der zweithäufigsten Gruppe von Phagenultrastrukturen überhaupt, den *Myoviridae* mit dicken, kontraktilen Schwänzen (6).

Eine weitere Teilaufgabe bestand darin, durch Bestimmung der Lysisspektren einer möglichst großen Zahl individueller Stämme von *Fusobacterium varium* jene Phagen zu ermitteln, die innerhalb dieser Spezies möglichst viele der in die Untersuchungen einbezogenen Stämme zu lysieren vermögen, um durch Kombination von wenigen Phagen ein lytisch aktives Gemisch zu

erhalten, mit dem alle Vertreter dieser Spezies lysiert werden und dadurch einer Speziesbestimmung zugeführt werden können.

Die Untersuchung der Lysisspektren sollte darüber hinaus nicht nur zur Phagencharakterisierung beitragen, sondern gleichzeitig der Erkennung von Stämmen gelten, die von allen verfügbaren Phagenisolaten lysiert werden und die somit als universelle Indikatorstämme für den Nachweis von Phagen als virale Kontaminanten in Abwasserproben dienen könnten.

Schließlich war mit Hilfe der Bestimmung der spezifischen lytischen Aktivität der Frage nachzugehen, ob – vergleichbar zu anderen anaeroben Spezies – die Indolbildung (41) auch bei *Fusobacterium varium* eine speziesspezifische Eigenschaft darstellt oder ob sowohl indolpositive wie indolnegative Stämme von ein und demselben speziesspezifischen Phagen lysiert werden und beide somit tatsächlich – wie in der Literatur angegeben – zu einer einheitlichen Spezies gehören. Im letztgenannten Fall wären damit gleichzeitig Phagen gewonnen, die sich für Transduktionsexperimente innerhalb der Spezies *Fusobacterium varium* mit der Indolbildung als Unterscheidungsmerkmal zwischen Donatoren und Transduktanten eignen würden.

2 Materialien

2.1 Bakterienstämme

Insgesamt wurden 44 Stämme anaerober gramnegativer Stäbchen der Genera *Fusobacterium* und *Bacteroides* in die Untersuchungen einbezogen. Bei diesen Stämmen handelte es sich sowohl um Referenzstämme international anerkannter Stammsammlungen wie z.B. VPI, RMA und ATCC als auch um institutseigene Stämme, die aus klinischen Untersuchungsproben isoliert worden waren. Hinzu kamen einzelne Isolate anderer Laboratorien, die mit der Bitte um Identifizierung an das INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG eingesandt worden waren, sowie einige Stämme aus individuellen Stammsammlungen.

Für die Isolierung der Phagen wurden 29 Stämme eingesetzt. Davon gehörten 28 Stämme zum Genus *Fusobacterium*, wobei folgende Spezies vertreten waren: *F. varium* (11 Stämme), *F. mortiferum* (4 Stämme), *F. necrophorum* (10 Stämme), *F. gonidiaformans* (1 Stamm) und 2 nicht auf Speziesebene identifizierte Stämme. Zu Vergleichszwecken wurde ein Stamm von *Bacteroides fragilis* (HSP-40) in die Isolierungsversuche einbezogen. Für die Ermittlung der Lysisspektren wurden neben den für

die Isolierung eingesetzten Stämmen weitere Stämme des Genus *Fusobacterium* herangezogen, die in der Zwischenzeit neu isoliert oder unserem Institut zugesandt worden waren.

Die folgende Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der verwendeten Bakterienstämme. Die Tabelle 3 gibt Auskunft über die Stämme, die zur Bestimmung der Lysisspektren zusätzlich zu den in Tabelle 2 genannten herangezogen wurden.

Tabelle 2: Zur Phagenisolierung verwendete Bakterienstämme, in der letzten Spalte ist jeweils die für die Isolierung verwendete Abwasserprobe angegeben

Lfd. Nr.	Stamm-Nr.		Spezies	Abwasser Nr.	
				1	2
1	HSP	40	<i>Bacteroides fragilis</i>	+	+
2	ATCC	8501	<i>Fusobacterium varium</i>	+	+
3	ATCC	25286 F	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	+	+
4	VPI	2377	<i>Fusobacterium varium</i>	+	+
5	VPI	2392	<i>Fusobacterium varium</i>	+	+
6	VPI	2527	<i>Fusobacterium varium</i>	+	+
7	Hu	2495	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	+	+
8	Li	5	<i>Fusobacterium varium</i>	+	+
9	Na	5	<i>Fusobacterium varium</i>	+	+
10	Na	95-938/5	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	-	+
11	Na	95-939/6	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	-	+
12	MLU	81-365	<i>Fusobacterium species</i>	+	+
13	MLU	81-495/1	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	+	+
14	MLU	81-531/2	<i>Fusobacterium varium</i>	+	+
15	MLU	82	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	-	+
16	MLU	82-226/1	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	+	+
17	MLU	82-245/3	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	+	+
18	MLU	82-552/1	<i>Fusobacterium varium</i>	+	+
19	MLU	83-4/1	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	-	+
20	MLU	83-12/4	<i>Fusobacterium species</i>	+	+
21	MLU	83-270/3	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	+	+
22	MLU	83-554/3	<i>Fusobacterium varium</i>	+	+
23	MLU	83-680/3	<i>Fusobacterium varium</i>	-	+
24	MLU	86-616/2	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	+	+
25	MLU	88-1720/2	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	+	+
26	MLU	89-13148	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	-	+
27	MLU	89-823/2	<i>Fusobacterium gonidiaformans</i>	+	+
28	MLU	91-2135/2	<i>Fusobacterium varium</i>	+	+
29	MLU	95-1538/2	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	+	+

Tabelle 3: Zur Testung der Lysisspektren zusätzlich verwendete Bakterienstämme

Lfd. Nr.	Stamm-Nr.	Spezies
1	ATCC 25563	<i>Fusobacterium gonidiaformans</i>
2	MLU 83-188/2	<i>Fusobacterium varium</i>
3	MLU 91-263/3	<i>Fusobacterium varium</i>
4	MLU 91-2135/2	<i>Fusobacterium varium</i>
5	MLU 91-2296/3	<i>Fusobacterium varium</i>
6	MLU 91-2641/1	<i>Fusobacterium varium</i>
7	MLU 92-932/2	<i>Fusobacterium varium</i>
8	MLU 92-1282/3	<i>Fusobacterium varium</i>
9	MLU 94-452	<i>Fusobacterium varium</i>
10	MLU 98-971/3	<i>Fusobacterium varium</i>
11	RMA 1065	<i>Fusobacterium species</i>
12	RMA 1343	<i>Fusobacterium varium</i>
13	RMA 2453	<i>Fusobacterium species</i>
14	RMA 5169	<i>Fusobacterium varium</i>
15	RMA 6938	<i>Fusobacterium varium</i>

2.2 Nährmedien und Zusätze

2.2.1 Flüssige Medien

Zur Phagenisolierung, deren Anreicherung und Austitration sowie zur Kultivierung und Stammhaltung der Bakterienstämme diente eine modifizierte BRAIN-HEART-INFUSION (BHI)-Bouillon folgender Zusammensetzung nach HÖHNE (46):

Brain-Heart-Infusion (Difco)	37,0 g	(28)
Yeast-Extract (Difco)	5,0 g	
L-Cysteinhydrochlorid (Serva)	0,3 g	
Häminlösung (0,5 mg/ml)	10,0 ml	
Vitamin K1-Lösung (1%ig)	1,0 ml	
Aqua dest. ad	1000,0 ml	

Die Substanzen wurden im Dampftopf in Aqua dest. gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Für die Stammkultivierung und –haltung wurde die fertige Bouillon in Reagenzröhrchen zu 10 ml abgefüllt, zu denen noch je ein Stück Marmor und ein haselnußgroßes Stück Gehirn zugegeben wurden. Abschließend wurde für 15 Minuten bei 121° C autoklaviert.

Zu der BHI-Bouillon für die Phagenisolierung, -klonierung und -anreicherung wurden noch jeweils 10 ml 0,1 M Magnesiumchlorid- und 0,1 M Kalziumchloridlösung zugegeben und die Bouillon anschließend in 500 ml-Erlenmeyerkolben abgefüllt.

Die Isolierung der Phagen direkt aus dem Abwasser erfolgte mit einer fünffach konzentrierten BHI-Bouillon, die im Verhältnis 1:4 mit den Abwasserproben gemischt wurde. Dazu wurden alle Substanzen in fünffacher Konzentration angesetzt, anschließend die Bouillon in Portionen von je 50 ml in 100 ml-Erlenmeyerkolben abgefüllt und autoklaviert.

2.2.2 Feste Medien

Als feste Medien wurden modifizierter Brain-Heart-Infusion (BHI)-Agar, BHI-Weichagar, Hammelblut (HB)-Agar und M5-Medium eingesetzt.

Der BHI-Agar entsprach hinsichtlich der Zusammensetzung der verwendeten BHI-Bouillon, enthielt aber darüber hinaus noch 1,5 % Noble Agar (Difco). Alle Bestandteile wurden im Dampftopf gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und anschließend für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nach Abkühlung auf 55° C wurde das Medium in Petrischalen ausgegossen und die Platten nach Erkalten im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

Der BHI-Weichagar enthielt dagegen nur 0,6 % Agar. Nach Lösung der Komponenten und Einstellung des pH-Wertes wurde er in Portionen zu je 250 ml in Erlenmeyerkolben abgefüllt und autoklaviert.

Der für die aeroben Wachstumskontrollen verwendete Hammelblut (HB)-Agar entsprach dem üblichen Routinenährboden des INSTITUTES FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG. Für die anaeroben Wachstumskontrollen diente das M5-Medium folgender Zusammensetzung:

Medium Nr.5 (HÖHNE, unveröff.):

Nähragar I (SIFIN)	35,0 g
Fleischextrakt pulv.	3,0 g
Cysteinhydrochlorid	0,3 g
Häminlösung (0,5 mg/ml)	10,0 ml
Vitamin K1-Lösung (1%ig)	1,0 ml
Agar	5,0 g
Aqua dest.	1000,0 ml

Nähragar I, Fleischextrakt und Agar wurden in Aqua dest. Im Dampftopf gelöst und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Anschliessend wurden Cysteinhydrochlorid und Hämin hinzugesetzt und für 15' bei 121°C autoklaviert. Dem auf 55°C abgekühlten Medium wurden die Vitamin K1-Lösung, 5 ml lysiertes und 50 ml defibriertes Hammelblut zugefügt und in Petrischalen ausgegossen.

2.2.3 Zusätze

Die zur Supplementierung der Medien benutzte Häminlösung war wie folgt zusammengesetzt:

Hämin	50,0 g
NaOH (1N)	1,0 ml
Aqua dest. ad	100,0 ml

Anschließend wurde die Lösung bei 121° C für 15 Minuten autoklaviert.

Als Vitamin K1-Lösung wurde fertig ampulliertes Konaktion MM[®] (10mg/ml, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen) verwendet.

Die 0,1 M Magnesiumchlorid- und Kalziumchloridlösung wurde in Aliquots zu 100 ml in Erlenmeyerkolben abgefüllt und nach dem Autoklavieren bis zur Verwendung bei 4° C aufbewahrt.

2.3 Puffer und Lösungen für die molekularbiologischen Untersuchungen

Die Herstellung der Pufferlösungen erfolgte in Anlehnung an SAMBROOK et al. (68).

2.3.1 Materialien für die Proteinanalyse

SM-Puffer:

NaCl	2,9 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,0 g
1 M Tris/HCl (pH 7,5)	25,0 ml
Gelatinelösung (2%ig)	2,5 ml
Aqua bidest. ad	1000,0 ml

TM-Puffer:

MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2,46 g
1 M Tris/HCl (pH 7,5)	50,0 ml
Aqua bidest. ad	1000,0 ml

Elektrodenpuffer:

Tris	50 mM
Glycin	380 mM
SDS	0,1 % (w/v)
pH 8,3 (HCl)	

4x Sammelgelpuffer:

Tris	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)
pH 6.8 (HCl)	

4x Trenngelpuffer:

Tris	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)
pH 8.8 (HCl)	

SDS-Probenpuffer:

Sammelgelpuffer	18,0 % (v/v)
SDS	2,9 % (w/v)
2-Mercaptoethanol	9,0 % (v/v)
Glycerin	36,4 % (v/v)
Bromphenolblau	0,7 % (w/v)
pH 6.8 (HCl)	

SDS-Trenngel (12%):

Rotiphorese Gel 30 (30% Acryl-Bisacrylamid-Lösung)	4,0 ml
4x Trenngelpuffer	2,5 ml
APS, 10% (w/v)	35,0 µl
TEMED	7,0 µl
Aqua bidest.	3,5 ml

SDS-Sammelgel (6%):

Rotiphorese Gel 30	1,2 ml
4x Sammelgelpuffer	1,5 ml
APS, 10% (w/v)	20,0 µl
TEMED	4,0 µl
Aqua bidest.	3,3 ml

Fixierlösung:

Isopropanol	25 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Färbelösung:

Coomassie Brilliant Blue G250	0,006 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Entfärbelösung:

Essigsäure	10 % (v/v)
------------	------------

Protein-Marker (PROMEGA):

Mid-Range-Protein Molecular Weight Marker (MG 14400 – 97400 Da)

2.3.2 Materialien für die DNS-Analyse

Zur Isolierung der Phagen-DNS wurde ein kommerzielles Extraktions-Kit verwendet (Wizard[®] Lambda Preps DNA Purification System, PROMEGA Mannheim). Dieses System enthielt alle für die Extraktion und Aufbewahrung der Phagen-DNS erforderlichen Reagenzien und Hilfsmittel. Weiterhin wurden verwendet:

50 x TAE-Puffer:

Tris	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA	100 mM
pH 8,1 (HCl)	

Agarose-Gel 1% (w/v):

Agarose	0,5 g
1x TAE-Puffer	50 ml
Ethidiumbromidlösung (1mg/ml)	25 µl

Probenpuffer:

Tris	10 mM
EDTA	1 mM
Glycerin	50 % (v/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)

Die isolierte DNS wurde einer Restriktionsanalyse unterzogen. Die dabei verwendeten Restriktionsendonukleasen (PROMEGA, Mannheim) sind in Tabelle 4 dargestellt. Ihre Lagerung erfolgte bei -20° C.

Tabelle 4: Zur DNS-Analyse verwendete Restriktionsendonukleasen mit Angabe der Erkennungssequenzen
(die Pfeile markieren die Schnittstellen)

Bezeichnung	Erkennungssequenz
<i>EcoRI</i>	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5'
<i>HindIII</i>	5'...A↓AGCTT...3' 3'...TTCGA↑A...5'
<i>HinfI</i>	5'...G↓ANTC...3' 3'...CTNAG↑...5'
<i>Sau3A I</i>	5'...↓GATC...3' 3'...CTAG↑...5'
<i>Ava I</i>	5'...C↓(T/C)CG(A/G)G...3' 3'...G(A/G)GC(T/C)↑C...5'

DNS-Längenstandards (PROMEGA):

1 kb DNA – Ladder (250 – 10000 bp)

Lambda DNA EcoR I + Hind III Marker (125 – 21226 bp)

Weitere verwendete Materialien:

Ethidiumbromidlösung 1mg/ml (PROMEGA)

Polyethylenglycol 6000 (PROMEGA)

Agarose für DNS-Elektrophoresen (SERVA)

Blue/Orange loading dye (PROMEGA)

3 Methoden

3.1 Anaerobioseverfahren

3.1.1 Flüssigkulturen in BHI-Bouillon

Die verwendeten Keime wurden aus dem jeweiligen Stammröhrchen entnommen und in eine frische BHI-Bouillon eingimpft. Zuvor war diese 10 Minuten lang im siedenden Wasser erhitzt, danach abgekühlt und mit 0,1 ml Kälberserum (KS) versetzt worden. Anschließend wurden die Röhrchen sofort mit einer 0,5 cm hohen Schicht steriler, verflüssigter Vaseline verschlossen und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig erfolgte das Ausstreichen aerober Kontrollen auf Hammelblutagar und ebenfalls Inkubation für 18-24 Stunden bei 37° C.

3.1.2 AnaeroGen-Topfsystem

Verwendung fand ein standardisiertes Topfsystem der Firma OXOID (OXOID AnaeroGen). In einen 2,5 Liter fassenden Topf wurden die Platten bzw. Bouillons zusammen mit dem die Anaerobiose bewirkenden Papierbeutel und einem mit Resazurinlösung getränktem Baumwollindikatorstreifen (OXOID) zur Überprüfung des Redoxpotentials im Topf eingebracht. Das verwendete System bot den Vorteil, daß für die chemische Reaktion zur Entfernung des Sauerstoffs und die Freisetzung des Kohlendioxides keine Zugabe von Wasser erforderlich war.

3.2 Methoden zur Isolierung, Charakterisierung und Anreicherung der Phagen

3.2.1 Isolation von *Fusobacterium*-Phagen aus Abwasser

Die zwei verfügbaren Abwasserproben stammten aus dem Klärwerk Nord in Halle. Die Entnahme erfolgte nach ausschließlich mechanischer Reinigung des Abwassers.

Die frische Abwasserprobe wurde 30 min bei 13000 U/min und 4°C (Tischzentrifuge JOUAN MJ 22i) zentrifugiert und der Überstand durch ein bakteriendichtes Filter der Porengröße 0,45 µm (Filtropur S 0,45 – Spritzenfilter, SARSTEDT) filtriert. In einem 100 ml fassenden sterilen Erlenmeyerkolben wurden 10 ml 5fach konzentrierte BHI-Bouillon mit 40 ml des Abwasserfiltrates versetzt und 3 ml einer frischen Übernachtskultur (onc) des potentiellen Vermehrungsstammes hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Inkubation im Anaerobentopf bei 37°C für 18-24 h, worauf das Gemisch bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert und wiederum bakteriendicht filtriert wurde. Die Prüfung auf Anwesenheit von Phagen im Filtrat erfolgte sowohl im Spotttest als auch mit der Agar-Überschichtungsmethode (OL) nach ADAMS (7). Außerdem wurden vom Filtrat eine aerobe und eine anaerobe Wachstumskontrolle angelegt.

3.2.1.1 Spotttest

Zur Durchführung des Spotttestes wurde in ein steriles Röhrchen 0,1 ml einer 1:10 verdünnten Übernachtskultur des Vermehrungsstammes in BHI-Bouillon gegeben. Anschließend wurde dieses Röhrchen mit 3,5 ml verflüssigtem, auf 52° C temperierten Weichagar versetzt und nach dem Mischen des Inhaltes 3 ml auf der BHI-Platte für den Spotttest ausgegossen. Die offene Platte wurde neben der Bunsenflamme stehen gelassen, bis der Weichagar verfestigt war. Danach wurde ein Tropfen des Filtrates auf die BHI-Platte aufgetropft. Diese blieb bis zum Antrocknen des Tropfens auf waagerechter Unterlage stehen. Anschließend erfolgte die Inkubation im Anaerobentopf bei 37° C für 24-48 h.

3.2.1.2 Overlay

Zur Durchführung des „overlay“ (OL) wurden in ein steriles Röhrchen 0,4 ml des Filtrates und 0,1 ml der 1:10 verdünnten Übernachtskultur des Vermehrungsstammes pipettiert. Anschließend wurden 3,5 ml Weichagar dazugegeben, der Inhalt kurz gemischt und 3 ml davon auf einer BHI-

Platte ausgegossen. Nach dem Erstarren erfolgte die Inkubation dieser Platte zusammen mit der Petrischale für den Spotttest 24-48h im Anaerobentopf. Die Anwesenheit von Phagen war durch Plaquebildung im Bakterienrasen zu erkennen.

3.2.2 Bestimmung der Phagenkonzentration

Die Ermittlung der pfu erfolgte orientierend mit dem Spotttest bzw. definitiv mit der overlay-Methode unter Verwendung von Verdünnungen der Lysate bis zur Verdünnungsstufe 10^{-12} .

Für die Konzentrationsbestimmung im „overlay“ wurde demnach vom Phagenlysat eine geometrische Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-12} hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 0,4 ml Phagenlysat in einem sterilen Röhrchen mit 0,1 ml einer 1:10 verdünnten Übernachtskultur des Vermehrungsstammes und mit 3,5 ml verflüssigtem Weichagar gemischt und davon 3 ml auf einer BHI-Agarplatte ausgegossen. Nach dem Erstarren wurden die Platten im Anaerobentopf bei 37° C für 24-48h inkubiert. Die Zahl der Plaques auf der Platte der höchsten Verdünnungsstufe wurde ausgezählt. Die Konzentration der Phagen im Lysat ergab sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Plaqueanzahl} \cdot 3,33}{\text{Verdünnungsstufe}} = \text{pfu / ml}$$

Zur Durchführung des Spotttestes wurde eine BHI-Platte, wie schon unter 3.2.1.1 beschrieben, mit einer Keimsuspension des Vermehrungsstammes in BHI-Weichagar überschichtet. Nach dem Verfestigen des Weichagars wurde von jeder Verdünnungsstufe des Phagenlysates ein Tropfen aufgebracht, an der offenen Flamme bis zum Trocknen des Tropfens belassen und anschließend im Anaerobentopf inkubiert. Plaquebildung im bewachsenen Weichagar zeigte die Anwesenheit von Phagen an. Die Routine-Test-Dilution entsprach der niedrigsten Phagenkonzentration, bei der der Spotttest gerade noch eine konfluente Lysis zeigte.

3.2.3 Klonierung der Phagen

Die Klonierung der Phagen erfolgte durch Einzelplaqueanreicherung (EPA) auf dem Indikatorstamm. Sie wurde wie folgt durchgeführt:

Ein 100 ml fassender Erlenmeyerkolben wurde mit 40 ml BHI-Bouillon gefüllt und 15 Minuten im siedenden Wasserbad behandelt. Nach dem Abkühlen wurden 15 Tropfen der Übernachtskultur des Vermehrungsstammes in den Kolben gegeben und gleichzeitig eine neue

BHI-Bouillon beimpft. Anschließend wurde von der „overlay“-Platte mit einem sterilen Lochbohrer ein einzeln stehender Plaque ausgestanzt und unter sterilen Bedingungen in den Kolben gegeben. Danach wurde über Nacht bei 37° C im Anaerobentopf inkubiert.

Am Folgetag wurde die BHI-Bouillon wiederum bei 13000 U/min für 30 min zentrifugiert und der Überstand durch ein bakteriendichtes Filter gegeben. Zur Konzentrationsbestimmung folgte nach jeder EPA eine Austitration des erhaltenen Lysates nach der „overlay“-Technik und parallel dazu im Spotttest. Die EPA wurde insgesamt 3 mal durchgeführt, wobei vom erhaltenen Lysat jeweils eine aerobe und anaerobe Kontrolle mitgeführt wurden.

3.2.4 Anreicherungstechniken

Zur Phagenanreicherung wurde die Bouillonanreicherung (BA) eingesetzt. Für die BA erfolgte die Beimpfung des Vermehrungsstammes mit 1000 pfu des jeweiligen Phagenlysates. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie bei der EPA beschrieben. Wenn mit der Bouillonanreicherung keine für die weiterführenden Untersuchungen ausreichenden Titer erzielt werden konnten, kamen testweise sowohl die Einzelplaqueanreicherung als auch eine modifizierte Bouillonanreicherung mit Beimpfung von 100 bis 10000 pfu zum Einsatz.

3.2.5 Langfristige Aufbewahrung der Phagenlysate

Ein Teil der Phagenlysate sollte nach Abschluß der Untersuchungen langfristig aufbewahrt werden. Dazu wurden 7 Eppendorf-Röhrchen pro Phage mit dem zur Lagerung vorgesehenen Lysat gefüllt. Jeweils 5 dieser Röhrchen wurden aus einer Mischung von 10 ml 87%igem Glycerin und 7,4 ml Phagenlysate befüllt (somit 50% Glycerol w/v). Zwei der Röhrchen blieben ohne jeglichen Zusatz. Die abgefüllten Eppendorf-Röhrchen wurden senkrecht stehend in Kartons verpackt und bei -73°C gelagert. Mit dieser Methode waren alle Phagen auch nach 1/2-1 Jahr noch aus den eingefrorenen Proben vermehrbar, wie sich in durchgeführten Anreicherungsversuchen und anschließenden Spot-Tests zeigte.

3.2.6 Bestimmung des Lysisspektrums

Zur Bestimmung des Lysisspektrums wurde von jedem zu testenden Bakterienstamm eine Platte in der für den Spotttest beschriebenen Weise hergestellt. Nach dem Trocknen der Platten wurden die Phagenlysate in der RTD aufgetropft, wobei jeder Phage mit jedem Teststamm untersucht wurde. Die RTD ist diejenige Phagenlysateverdünnung, bei der im Spotttest eine gerade noch konfluente Lysis entsteht (RISCHE 1973). Sie wurde zuvor für jedes einzelne Phagenlysate bestimmt. Alle Phagen wurden mit einer speziellen Öse an verschiedenen Stellen auf dieselbe Platte mit dem zu testenden Stamm aufgebracht. Neben der RTD wurde auch eine 1000fache Konzentration der RTD in die Bestimmungen mit einbezogen.

3.2.7 Versuche zur Chloroformresistenz

Zur Bestimmung der Chloroformresistenz über einen längeren Zeitraum wurden alle im Rahmen dieser Arbeit isolierten Phagen herangezogen. Dazu wurden 40 ml Lysate eines Anreicherungsansatzes bekannten Titers geteilt. Es erfolgte eine Unterschichtung der einen Lysathälfte mit 0,5 ml Chloroform, während die andere Hälfte ohne Chloroform belassen wurde. Das Chloroform verblieb während der gesamten Untersuchungszeit in den Proben. Beide Proben wurden regelmäßigen Titerkontrollen anhand der overlay-Technik unterzogen und die Ergebnisse miteinander verglichen. Der Chloroformtest ermöglicht die Unterscheidung zwischen Bakteriophagen mit und ohne dem Vorhandensein von Lipiden oder Lipoproteinen, die durch das Chloroform herausgelöst würden.

3.2.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden von Dr. W. Verhagen im INSTITUT FÜR VIROLOGIE UND SEUCHENHYGIENE der MEDIZINISCHEN HOCHSCHULE HANNOVER angefertigt. Dazu wurden zunächst 5 µl der Lysate auf einen Formvar-Kohlenstoff-Präparateträger aufgebracht, mit Aqua bidest. gewaschen und mit einer Lösung von 2% Uranylacetat kontrastiert. Die Aufnahmen erfolgten anschließend mit dem Elektronenmikroskop E 201 (Philips). Bei ungenügender Darstellung der Phagen aufgrund geringer Titer wurden diese einer Konzentration mittels Ultrazentrifugation unterzogen, die ebenfalls in Hannover stattfand. 2 ml des Phagenlysates wurden mit einer Beckman TL-100

Zentrifuge (Rotor TLS-55) bei 4°C und 25900 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Die weiteren Arbeitsschritte zur elektronenoptischen Aufnahme wurde dann wie oben beschrieben fortgesetzt. Bei der Auswertung erfolgte zur Ermittlung von Durchschnittswerten die Ausmessung der Phagen auf mehreren Aufnahmen. Zur anschließenden Größenberechnung wurden die Vergrößerungsfaktoren des optischen Systems herangezogen.

3.3 Methoden zur DNS-Analyse

3.3.1 Präparation der Phagen-DNS

Die Präparation der DNS erfolgte in Anlehnung an SAMBROOK et al. (68). Neben einer dort beschriebenen und in unserem Institut schon erprobten Methode kam zusätzlich zur Extraktion der DNS aus dem jeweiligen Phagenlysate das Extraktions-Kit „WIZARD® Lambda Preps DNA Purification System“ der Firma PROMEGA zur Anwendung.

Zunächst wurden je 10 ml des vorbereiteten Phagenlysates in ein Zentrifugenröhrchen überführt, ein jedes mit 40 µl des mitgelieferten Nuclease-Mixes versetzt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden 4 ml des Präzipitationsagens zugegeben, langsam gemischt und 30 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Gemisch 10 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert und das Pellet in 500 µl Phagenpuffer (*phage buffer*) resuspendiert, wobei man mehrfach langsam an den Seiten des Zentrifugenröhrchens hinab pipettierte, um eine vollständige Resuspension zu erreichen. Die wieder in Lösung gebrachten Phagen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt, 10 Sekunden bei 10000 x g zentrifugiert (ABOTT Tischzentrifuge) und der entstehende Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert. Nach Zugabe von 1 ml des *purification resin* (Reinigungsagens) und Mischen folgten die eigentlichen Extraktionschritte. Dazu wurden von den mitgelieferten Spritzen die Stempel entfernt und die Spritzenkörper auf die Minisäulen aufgeschraubt. Das Gemisch aus Resin und Lysat wurde in diese Säulen pipettiert und der Stempel wieder in die Spritzen eingesetzt. Danach wurde der Inhalt in die Säule gedrückt. Anschließend wurden die Spritzen von den Minisäulen getrennt, der Stempel wieder entfernt und die Spritzen wieder mit den Säulen verbunden. Nach Zugabe von 2 ml 80%igem Isopropanol und Zentrifugation für 2 Minuten bei 10000 x g wurden die Minisäulen auf ein Eppendorf-Röhrchen aufgesetzt und je 100 µl auf 80°C erhitztes destilliertes Wasser oder TE-Puffer in die Säulen zugegeben. Den letzten Schritt der Extraktion stellte dann das unmittelbare Zentrifugieren der Minisäulen für 20 Sekunden bei 10000 x g dar. Dieser Schritt diente zum Sammeln der gereinigten DNS in den Eppendorf-Gefäßen. Die gereinigte DNS wurde bei -20°C gelagert. Alternativ zu dem Spritzen-System war eine Extraktion grundsätzlich

auch mit einer Vakuum-Pumpe möglich, die das Durchsaugen der verschiedenen Flüssigkeiten durch die Minisäulen übernahm. Dieses Verfahren kam nur bei einer der Extraktionen zum Einsatz.

3.3.2 Restriktionsanalyse der DNS

Zur auf die Extraktion folgenden Restriktionsanalyse wurden die Restriktionsendonukleasen *Eco* RI, *Hind* III, *Hinf* I, *Sau*3AI und *Ava* I der Firma PROMEGA verwendet. Gemäß den vom Hersteller mitgelieferten Vorschriften erfolgte der Ansatz bestehend aus Enzym, beiliegendem 10X-Puffer und Aqua bidest., anschließend wurde das Gemisch bei 37°C für eine bis eineinhalb Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.3.3 Agarose-Gel-Elektrophorese der Restriktionsansätze

Für die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde die 1%ige DNS-Agaroselösung (SERVA) nach dem Aufkochen in die Gelgießeinrichtung eines Elektrophorese-Sets der Firma OWL (Gelgröße: 13,8 x 11,9cm) überführt und der Kamm bis zum Erstarren des Geles eingehängt. Nach der Polymerisation des Geles wurde die TAE-Pufferlösung in die Kammern eingegossen, die Restriktionsansätze mit 1µl Blue/Orange Loading Dye (PROMEGA) versetzt und nach vorsichtigem Entfernen des Kammes in die Slots des Geles gefüllt. Ebenso wurden die beiden verwendeten DNS-Marker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 70 Minuten bei einer Spannung von 120 V. Abschließend wurde das Agarose-Gel in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) gefärbt, unter dem Transilluminator im UV-Licht betrachtet und fotografiert.

Die Auswertung der Gele erfolgte computertechnisch, die Berechnung der Größenangaben der Banden anhand der mitgeführten Marker. Die im folgenden genannten Werte sind dabei jeweils gerundet. Dies ist sowohl bedingt durch die technischen Rahmenbedingungen, z.B. das Auflösungsvermögen des Agarosegels, als auch durch methodenbedingte mathematische Abweichungen.

3.4 Methoden zur Proteinanalyse

3.4.1 Extraktion der Phagenproteine

Die Extraktion der Phagenproteine erfolgte nach den von SAMBROOK et. al. (68) beschriebenen Methoden. Das durch die Anreicherungstechniken gewonnene Phagenlysat mit einem Titer von mindestens 10^8 pfu/ml wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit SM-Puffer verdünnt, NaCl bis zu einer Konzentration von 1 M zugegeben und die Suspension für eine Stunde im Eisbad inkubiert. Präzipitate wurden 10 Minuten bei $11000 \times g$ (Zentrifuge Jouan MJ 22i) und 4°C abzentrifugiert, das Sediment verworfen und dem phagenhaltigen Überstand 1 g Polyethylenglykol (PEG) 6000 je 10 ml zugesetzt. Nach der Fällung über Nacht im Eisbad folgte die Zentrifugation bei $11000 \times g$ und 4°C für 20 Minuten, Verwerfen des Überstandes und vorsichtige Entfernung noch vorhandener Flüssigkeitsreste. Das Pellet wurde in 1 ml TM-Puffer resuspendiert. Zum Abtrennen verbliebener PEG- und bakterieller Reste wurde die Suspension mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol im Mischungsverhältnis 49:1 versetzt, 30 Sekunden intensiv gemischt und 15 Minuten bei 4°C und $12000 \times g$ zentrifugiert.

Es folgte die Glycerolgradientenzentrifugation des wäßrigen, die Phagen enthaltenden Überstandes, wobei pro 10 ml – Zentrifugenröhrchen 2,5 ml 40% und 3 ml 5% Glycerol in TM-Puffer (v/v) vorgelegt wurden, nach Überschichten des Überstandes wurde mit TM-Puffer auf 10 ml aufgefüllt. Die Gradientenzentrifugation erfolgte für 90 Minuten bei $130000 \times g$ und 10°C (OTC Kombi-Plus-Ultrazentrifuge SORVALL/DuPont, USA, Ausschwing-Rotor TH-641). Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet in $50 \mu\text{l}$ 0,065 M Tris/HCl (pH 6,8) gelöst. Dem resuspendiertem Pellet wurden je $5 \mu\text{l}$ Glycerol, Mercaptoethanol und 23% wäßrige SDS-Lösung hinzugefügt und das Gemisch über Nacht bei 4°C gelagert. Die Weiterbehandlung erfolgte kurz vor der Elektrophorese.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinelektrophorese wurde in einer Mighty Small II – Elektrophoreseapparatur (Hofer Scientifics), unter Verwendung eines 10 Slot-Kamms und $8,0 \times 10,0$ cm Polyacrylamid-Gelen (SDS-Trenngel 12%, SDS-Sammelgel 6%) durchgeführt. Zum Gießen des Geles diente die mitgelieferte Einrichtung, in der die abgedichteten und mit Abstandhaltern versehenen Platten gehalten wurden. Das Trenngel wurde bis etwa 3 cm unter den oberen Rand eingefüllt und mit $100 \mu\text{l}$ Isopropanol überschichtet, um ein Austrocknen des Geles zu verhindern. Nach Polymerisation des Trenngels wurde der Isopropylalkohol mit Hilfe von Filterpapier vorsichtig

entfernt und mit Sammelgel bis zum oberen Rand aufgefüllt. Anschließend wurde der Kamm unter Vermeidung von Blasenbildung aufgesetzt und das Gel bis zur Polymerisation stehen gelassen. Nach Entfernung des Kammes folgte das Einsetzen des Geles in die Elektrophoreseapparatur, deren Kammern mit SDS-Laufpuffer gefüllt wurden. Vor Beginn der Elektrophorese wurden die Proteinproben (zwischen 10 und 25 µl) bis zu einem Gesamtvolumen von 30 µl mit Probenpuffer aufgefüllt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert (Heizblock). Nach dem Abkühlen wurden die Proben und ein Proteinstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 mA und 300 V und wurde, wenn das Bromphenolblau des Probenpuffers den Unterrand des Geles erreicht hatte, nach etwa 1 Stunde beendet. Nach Behandlung des Geles in der Fixierlösung für ½-1 Stunde stellte die Färbung des Geles den Abschluß dar.

3.4.3 Färbung der SDS-Polyacrylamidgele

Zur Färbung der Gele diente die Färbetechnik mit Comassie-Blau R-250 (PROMEGA). Im vorbereiteten Färbegrad wurde das Gel auf dem Wippschüttler bei Raumtemperatur für mindestens 30 Minuten behandelt und danach solange im Entfärbegrad belassen, bis die Banden deutlich sichtbar wurden bzw. sich das Gel ausreichend entfärbt hatte. Die Entfärbelösung wurde dabei regelmäßig ausgetauscht. Die gefärbten Gele wurden abfotografiert oder mit einem an einen Computer angeschlossenen Scanner eingelesen und anschließend getrocknet. Die Auswertung der Gele erfolgte anhand der mitgeführten Größenstandards.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung und Vermehrung der Phagen

Die Isolierungsversuche erfolgten aus 2 Abwasserproben, beide wurden in zeitlichem Abstand dem Klärwerk Nord in Halle/Saale jeweils nach ausschließlich mechanischer Reinigung dem Zulauf entnommen.

Die Prüfung auf Anwesenheit virulenter Bakteriophagen erfolgte mit den in Tabelle 2 (2.1) dargestellten Bakterienstämmen der Genera *Fusobacterium* und *Bacteroides* nach der im Abschnitt 3.2.1. beschriebenen Methode der Originalanreicherung

Aus dem Abwasser 1 konnten 4 Phagen isoliert werden. Einmal handelt es sich um einen Phagen mit Spezifität für *Bacteroides fragilis* HSP-40, zum anderen um 3 verschiedene Phagen mit lytischer Aktivität für die Vermehrungsstämme ATCC 8501, MLU 81-531/2 und MLU 83-554/3. Die drei letztgenannten Stämme gehören ausschließlich zur Spezies *Fusobacterium varium*.

Der im Abwasser 1 nachgewiesene *Bacteroides fragilis*-Phage wurde bei den Isolierungsversuchen aus dem Abwasser 2 nicht gefunden. Jedoch waren wiederum Phagen für *Fusobacterium varium* nachzuweisen. Neben den für die bereits bei Abwasser 1 erwähnten Vermehrungsstämme ATCC 8501, MLU 81-531/2 und MLU 83-554/3 waren dies Phagen, deren Nachweis über die Stämme von *Fusobacterium varium* Na 5 und MLU 83-680/3 erfolgreich war.

Insgesamt konnten 9 Phagen mit lytischer Aktivität gegen Stämme von *Fusobacterium varium* und ein Phage mit Spezifität für *Bacteroides fragilis* aus den beiden Abwasserproben isoliert werden. Eine Übersicht mit den zugewiesenen Phagenbezeichnungen und -kürzeln zeigt Tabelle 5. Die Bezeichnung der Bakteriophagen folgte der Nomenklaturempfehlung von ACKERMANN et al. (2, 5). Den klein geschriebenen Initialen der Bakterienspezies folgt die Stammnummer, damit die Zuordnung zum Vermehrungsstamm erkennbar ist. Da für ATCC 8501, MLU 81-531/2 und MLU 83-554/3 bereits von BÖHME (16) bei Isolierungsversuchen in unserem Institut Phagen gefunden wurden, folgte die Vergabe einer zusätzlichen fortlaufenden Nummer bei erneuten Isolierungen auf diesen Stämmen. Wegen der besseren Übersichtlichkeit in den tabellarischen und bildlichen Darstellungen wurden zusätzlich Kürzel in Form von Großbuchstaben benutzt.

Die Nachweisversuche mit Wirtsstämmen anderer Spezies wie *Fusobacterium mortiferum*, *F.necrophorum*, *F.gonidiaformans* und 2 Stämmen nicht auf Speziesebene identifizierten Fusobakterien verliefen negativ.

Der Phage fv 83-554/3/4 (I) ist der Vollständigkeit halber mitgeführt. Er wurde bei zunächst vermuteter Unterschiedlichkeit in der Plaquemorphologie auf der Agarplatte der 1.EPA von fv 83-554/3/3 (G) gesondert mitgeführt, kloniert und mittels der Bouillonanreicherung vermehrt. Beide Isolate, fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I), erwiesen sich jedoch in den nachfolgenden Untersuchungen zur DNS- und Proteinanalyse als völlig identisch. Auch die Plaquemorphologie war in der Folge einheitlich und identisch. Die scheinbare Unterschiedlichkeit der Plaquemorphologie auf der genannten Agarplatte blieb ein Einzelfall, und ist somit am ehesten methodischen Einflüssen zuzuschreiben.

Da wiederholt Vergleiche zu den 1996 von BÖHME (16) isolierten Phagen angestellt werden bzw. diese in die Untersuchungen miteinbezogen werden, sind sie in Tabelle 5 mit aufgeführt.

Tabelle 5: Phagen mit Spezifität für *Fusobacterium varium* bzw. *Bacteroides fragilis*, die aus 2 Abwasserproben der Kläranlage Nord in Halle isoliert wurden (Lfd. Nr. 1-10). Außerdem wurden die von BÖHME (16) isolierten Phagen mit aufgeführt (Lfd. Nr.11-15).

Lfd. Nr.	Phagenbezeichnung	Kürzel	Wirtsstamm	Abwasserprobe
1	fv 8501/2	A	<i>F. varium</i> ATCC 8501	1
2	fv 81-531/2/2	B	<i>F. varium</i> MLU 81-531/2	1
3	fv 83-554/3/2	C	<i>F. varium</i> MLU 83-554/3	1
4	fv 8501/3	D	<i>F. varium</i> ATCC 8501	2
5	fv Na5	E	<i>F. varium</i> Na 5	2
6	fv 81-531/2/3	F	<i>F. varium</i> MLU 81-531/2	2
7	fv 83-554/3/3	G	<i>F. varium</i> MLU 83-554/3	2
8	fv 83-680/3	H	<i>F. varium</i> MLU 83-680/3	2
9	fv 83-554/3/4	I	<i>F. varium</i> MLU 83-554/3	EPA
10	bf HSP-40	-	<i>Bacteroides fragilis</i> HSP 40	1
11	fv 8501	K	<i>F. varium</i> ATCC 8501	-
12	fv 81-531/2	L	<i>F. varium</i> MLU 81-531/2	-
13	fv 83-554/3	M	<i>F. varium</i> MLU 83-554/3	-
14	fv 2377	N	<i>F. varium</i> VPI 2377	-
15	fv 2527	O	<i>F. varium</i> VPI 2527	-

Die Klonierung der isolierten Phagen erfolgte nach dem Prinzip der Einzelplaquanreicherung, wobei Phagenkonzentrationen zwischen $4,0 \times 10^6$ pfu/ml und $2,6 \times 10^{11}$ pfu/ml erreicht wurden. (Tabelle 6)

Die abschliessend mit den Bouillonanreicherungen erzielten Titer lagen in ähnlichen Bereichen. Optimale Ergebnisse konnten bei beiden Anreicherungsarten mit Inkubationszeiten von 20-24 Stunden erzielt werden.

Tabelle 6: Phagentiter, die während der Klonierungsversuche mit den Einzelplaquanreicherungen erzielt wurden. Die Angaben erfolgten in pfu/ml Phagenlysat.

Phage	OR	1.EPA	2.EPA	3.EPA
fv 8501/2	$3,3 \times 10^8$	$3,3 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^{10}$
fv 81-531/2/2	$6,6 \times 10^8$	$4,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$1,3 \times 10^9$
fv 83-554/3/2	$2,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^9$	$3,3 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^9$
fv 8501/3	$1,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^8$	$2,3 \times 10^9$	$6,6 \times 10^9$
fv Na5	$1,3 \times 10^7$	$1,3 \times 10^{11}$	$6,6 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^{10}$
fv 81-531/2/3	$1,3 \times 10^6$	$6,6 \times 10^9$	$6,6 \times 10^9$	$2,6 \times 10^{10}$
fv 83-554/3/3	$3,3 \times 10^8$	$2,6 \times 10^{11}$	$2,3 \times 10^{11}$	$1,9 \times 10^{11}$
fv 83-680/3	$6,6 \times 10^6$	$3,3 \times 10^9$	$3,3 \times 10^9$	$4,3 \times 10^9$
bf HSP40	$1,1 \times 10^7$	$3,3 \times 10^7$	$6,6 \times 10^9$	$4,6 \times 10^7$

4.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Bei den elektronenoptischen Untersuchungen erfolgte neben der morphologischen Beurteilung und Gruppenzuordnung eine Ausmessung der Eck- und Seitendurchmesser, der Schwänze, sowie eine Beurteilung hinsichtlich Flexibilität und möglicher Kontraktilität der Schwänze, Streifung sowie vorhandenen Anhangsgebilden. Die Details sind vergleichend in Tabelle 7, die Aufnahmen der Bakteriophagen mit Maßstabsangabe in den Abbildungen 2 bis 5 dargestellt. Die Markierung in den Abbildungen entspricht dabei jeweils 100 nm. Die Endvergrößerung beträgt 70000fach. In der Tabelle 7 wurde auch der Zuordnung zu den drei Morphotypen Rechnung getragen. Bestimmte Merkmale wie z.B. Vorhandensein von Streifung des Schwanzes oder einer Bodenplatte waren teilweise nicht sicher nachweisbar und wurden entsprechend dokumentiert. Ebenso konnte die für den Morphotyp der *Myoviridae* typische Kontraktilität des Schwanzes nicht im Bild dokumentiert werden, dies hätte die elektronenoptische Aufnahme des Phagen in Adsorption bzw. im Stadium der DNS-Injektion in die Wirtszelle erfordert.

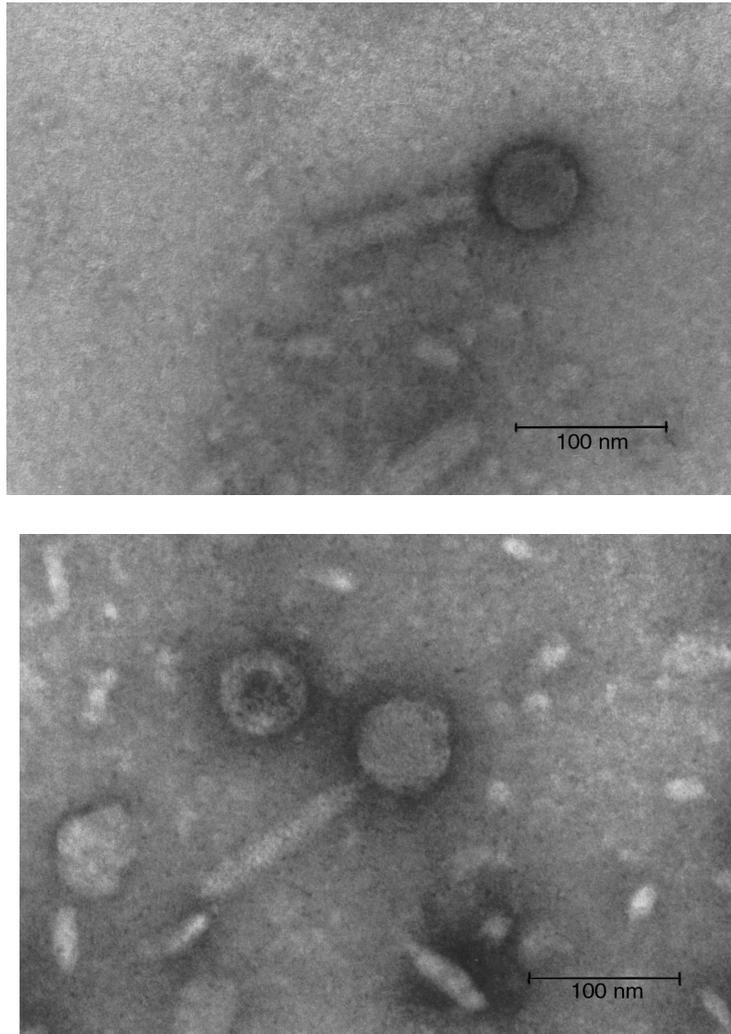


Abb. 2: Elektronenoptische Aufnahmen der Phagen fv 8501/2 (A) und fv 81-531/2/3 (F), beide gehören morphologisch zu den *Myoviridae*.

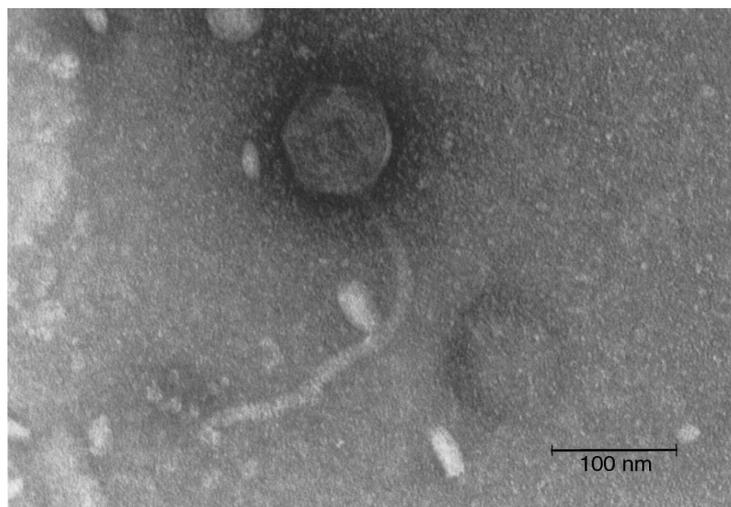
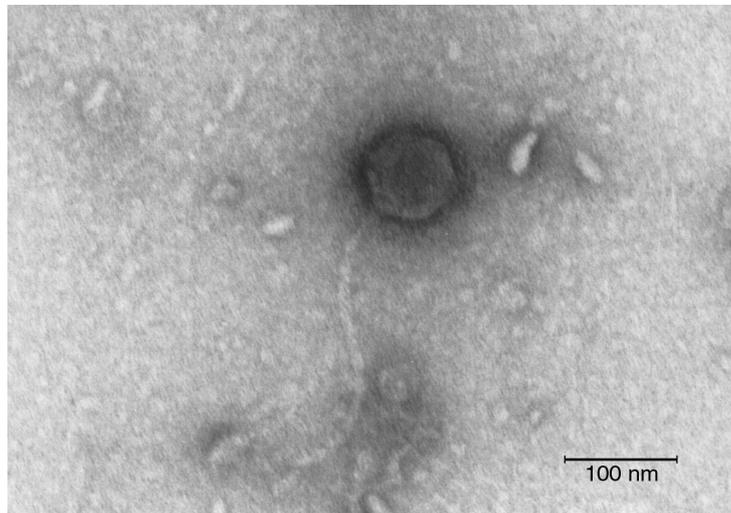
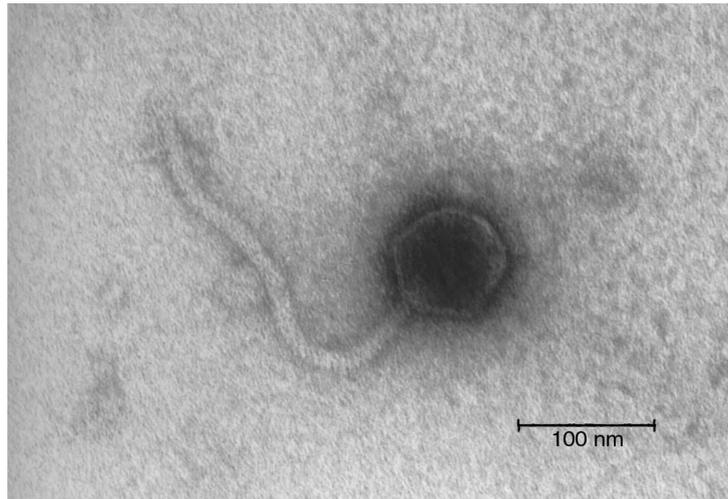


Abb. 3: Elektronenoptische Aufnahmen der Phagen fv 81-531/2/2 (B), fv 8501/3 (D) und fv 83-680/3 (H), alle gehören morphologisch zu den *Siphoviridae*.

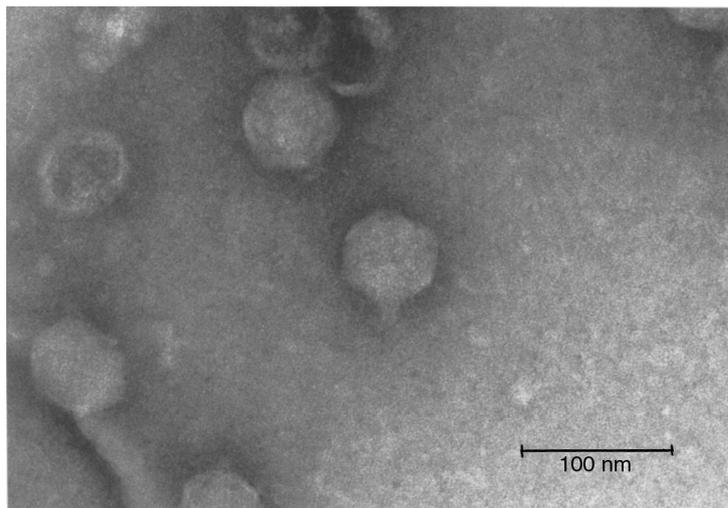
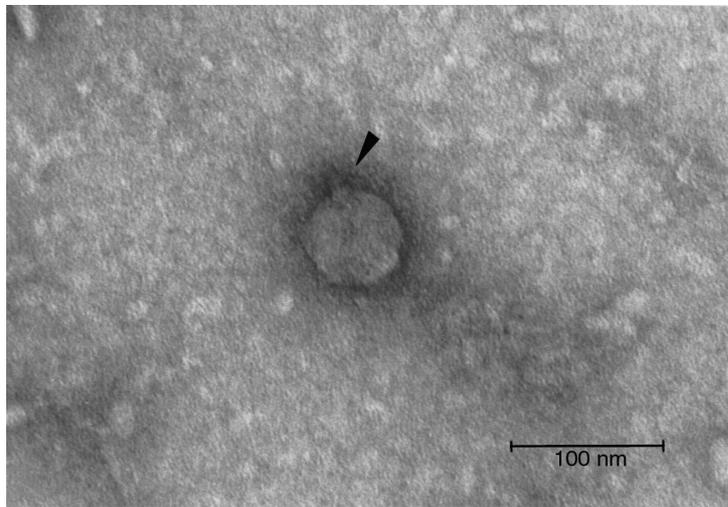
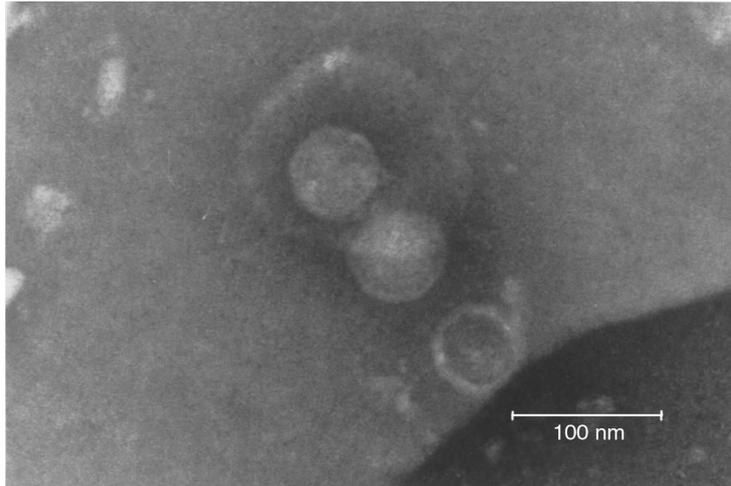


Abb. 4: Elektronenoptische Aufnahmen der Phagen fv 83-554/3/2 (C), fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G), alle gehören morphologisch zu den *Podoviridae*. Der schwarze Pfeil markiert den Schwanz (Phage E).

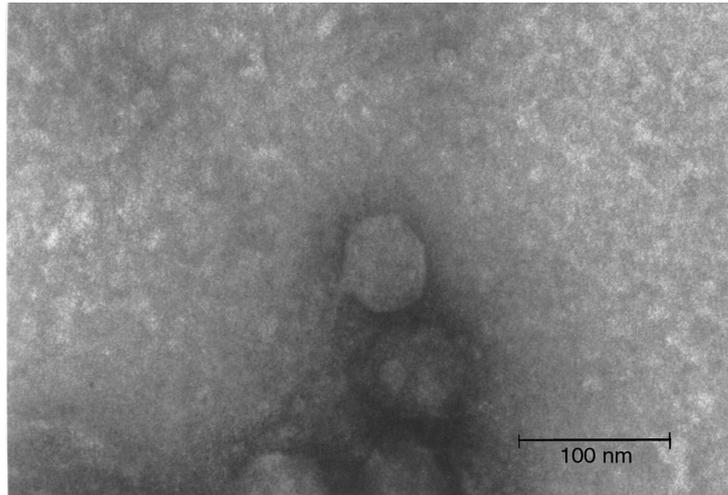


Abb. 5: Elektronenoptische Aufnahme des Phagen fv 83-554/3/4 (I), morphologisch zu den *Podoviridae* gehörend. Auch in allen anderen Charakterisierungsmerkmalen zeigte sich dieser Phage mit fv 83-554/3/3 (G) identisch.

Tabelle 7: Vergleich der strukturellen Merkmale der isolierten *Fusobacterium varium* – Phagen mit Größenangaben in Nanometern, w = Kontraktilität wahrscheinlich

Morphotyp	<i>Podoviridae</i>				<i>Siphoviridae</i>			<i>Myoviridae</i>	
	Phage C	E	G	I	B	D	H	A	F
Kopf									
Eckdurchmesser	70	65	65	65	80	83	95	60	65
Seitendurchmesser	65	60	60	60	75	78	85	55	60
Hals	-	-	-	-	-	-	?	+	+
Schwanz									
Länge	15	12	16	16	270	280	280	120	120
Breite	12	8	12	12	13	10	15	20	16
Flexibilität	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Streifung	-	-	-	-	+	?	+	?	+
Bodenplatte	-	-	-	-	-	-	-	+	?
Anhangsgebilde	-	-	-	-	-	-	-	+	?
Kontraktilität	-	-	-	-	-	-	-	w	w

Die Abbildungen 6 und 7 stellen Ausschnitte aus der Abbildung 2 dar, mit Bezeichnung der Einzelstrukturen. Neben dem isometrischen Kopf läßt sich deutlich eine Halsregion mit anschließendem Schwanz erkennen. Dieser endet bei fv 8501/2 (A) in der Bodenplatte, an der

spike-förmige Fortsätze seitlich angeschlossen sind. Der Phage fv 81-531/2/3 (F) zeigt eine besonders deutliche Halsregion und eine Querstreifung des Schwanzes (Abb.7).

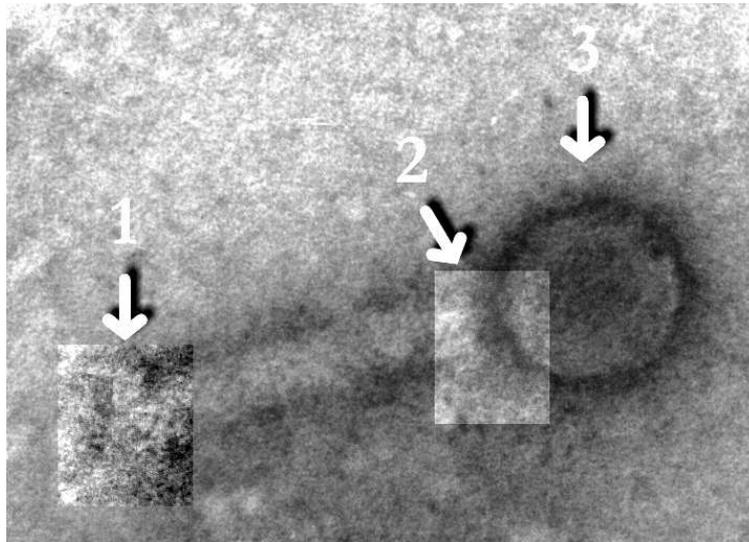


Abb. 6: Elektronenoptische Darstellung des Phagen fv 8501/2 (A) mit Detailbezeichnung, 1=Bodenplatte mit Anhangsgebilden, 2=Halsregion, 3=Kopf

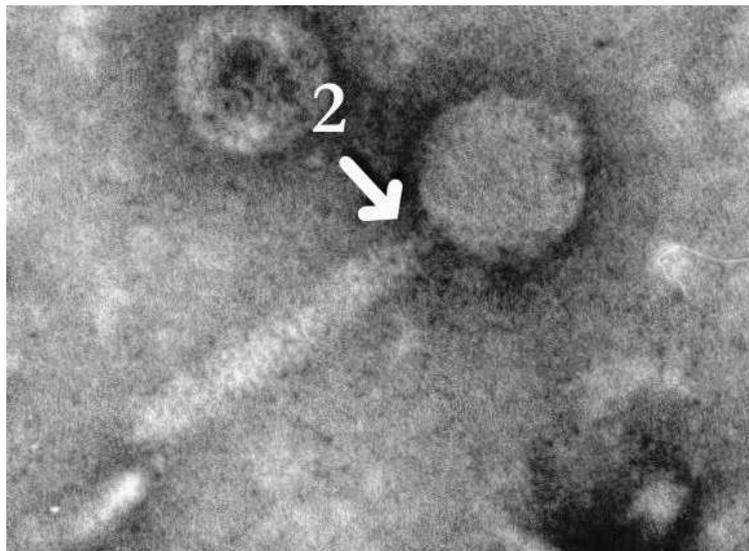


Abb. 6: Elektronenoptische Darstellung des Phagen fv 81-531/2/3 (F) mit Detailbezeichnung, 2=Halsregion

Die Phagen fv 83-554/3/2 (C), fv Na5 (E), fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) besitzen einen hexagonalen Kopf und einen kurzen, nicht kontraktilen Schwanz, sie sind demnach morphologisch den *Podoviridae* zuzuordnen. Der sehr kurze Schwanz der Phagen kam nicht in jeder Abbildung deutlich zur Darstellung, wie auch schon bei BÖHME (16) bzw. HÖHNE et al. (44) zu beobachten. Die neben den bekannten hexagonalen Köpfen durch lange, nicht kontraktilen aber flexible Schwänze unterschiedlicher Länge charakterisierten Phagen fv 81-531/2/2 (B), fv 8501/3 (D) und fv 83-680/3 (H) sind Vertreter der *Siphoviridae*. Dieser

Morphotyp wurde erstmals kürzlich bereits bei Phagen mit Spezifität für *Fusobacterium varium* durch BÖHME (16) bzw. HÖHNE et al. (44) beschrieben.

Im Gegensatz dazu konnte bei den Phagen fv 8501/2 (A) und fv 81-531/2/3 (F) neben dem polyhedralen isometrischen Kopf und deutlich sichtbarem Hals ein gestreckter, nicht flexibler, dicker und daher wahrscheinlich kontraktiler Schwanz beobachtet werden, der die Zuordnung zu den *Myoviridae* bzw. der Gruppe A nach BRADLEY bedeuten würde. Bei fv 81-531/2/3 (F) war die Querstreifung des Schwanzes deutlich sichtbar, bei fv 8501/2 (A) nicht. Bei letzterem Phagen gelang dafür die Abbildung einer Bodenplatte mit *spikes* trotz insgesamt schwieriger Darstellbarkeit und hoher Fragilität dieses Phagen im Halsbereich, was nach den Zentrifugationen die häufige Darstellung einzelner Schwänze ohne zugehörige Köpfe erklärt. Damit ist dies die erste Beschreibung von Phagen mit Spezifität für *Fusobacterium varium*, die der Gruppe der *Myoviridae* angehören.

4.3 Plaquemorphologie

Die Plaquemorphologie wurde anhand der Einzelplaques beurteilt, wie sie sich in der Overlaytechnik nach ADAMS (7) mit BHI-Weichagar darstellten. Berücksichtigt wurden die Einzelplaquedurchmesser, ob trübe oder klare Lysis vorlag, und die Art der Begrenzung der Plaques. Übersichten über die plaquemorphologischen Details gibt die Tabelle 8, wobei die Zuordnung zu den einzelnen Morphotypen berücksichtigt wurde. (siehe Abschnitt 4.2)

Tabelle 8: Plaquemorphologische Details der isolierten Phagen mit Spezifität für Stämme der Spezies *Fusobacterium varium* unter Berücksichtigung der Zuordnung zum Morphotyp (Durchmesserangaben in mm)

Phage	Morphotyp	Durchmesser	Begrenzung	Lysis	Kürzel
fv 8501/2	<i>Myoviridae</i>	2,5-4,5mm	scharf	trübe	A
fv 81-531/2/3	<i>Myoviridae</i>	0,5-3,0mm	unscharf	klar	F
fv 81-531/2/2	<i>Siphoviridae</i>	bis 1,0mm	scharf	klar	B
fv 8501/3	<i>Siphoviridae</i>	0,5-1,5mm	scharf	trübe	D
fv 83-680/3	<i>Siphoviridae</i>	0,5-2,5mm	unscharf	klar	H
fv 83-554/3/2	<i>Podoviridae</i>	1,0-3,0mm	scharf	klar	C
fv Na5	<i>Podoviridae</i>	2,0-5,0mm	scharf	klar	E
fv 83-554/3/3	<i>Podoviridae</i>	2,0-5,0mm	scharf	klar	G
fv 83-554/3/4	<i>Podoviridae</i>	2,0-5,0mm	scharf	klar	I

Obwohl zu differenten Morphotypen gehörig, zeigten die beiden für ATCC 8501 spezifischen Phagen eine trübe Lysis, während alle anderen Phagen klare Plaques aufwiesen. Ähnliches trifft bezüglich der unscharfen Plaquebegrenzung für die Phagen fv 81-531/2/3 (F) und fv 83-680/3 (H) zu. Die Durchmesser der Einzelplaques variierten stark zwischen den einzelnen Bakteriophagen, maximal wurden Werte bis zu 5,0 mm bei fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G) erreicht. Sehr kleine Plaques produzierte der Phage fv 81-531/2/2 (B), diese erreichten gerade eben 1,0 mm im Durchmesser. Insgesamt ließ sich eine Gruppenzuordnung anhand der Plaquemorphologie nicht feststellen, immerhin waren sich vor allem die Phagen fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G) ähnlich. Unterschiede und vergleichbare Plaquemorphologien wurden innerhalb der Morphotypen beobachtet, so daß nur in einem Teil der Fälle eine echte Unterscheidung begründet werden konnte. Der Beitrag der Plaquemorphologie zur Phagencharakterisierung ist somit insgesamt eher begrenzt.

Die folgenden Abbildungen 8-10 zeigen die einzelnen Plaquemorphologien im Bild. Unterschiede in Helligkeit und Kontrast der Bilder ergeben sich durch leicht variierende Beleuchtungs- und Fotografiertechnik sowie durch entsprechende technische Nachbearbeitung am Computer zur Verdeutlichung der einzelnen Plaquecharakteristika. Die optimale optische Erfassung der einzelnen Agarschalen mit den entsprechenden Plaquestrukturen war insbesondere bei sehr kleinen oder trüben Plaques schwierig und erforderte so gewisse technische Variationen der Aufnahmetechnik.

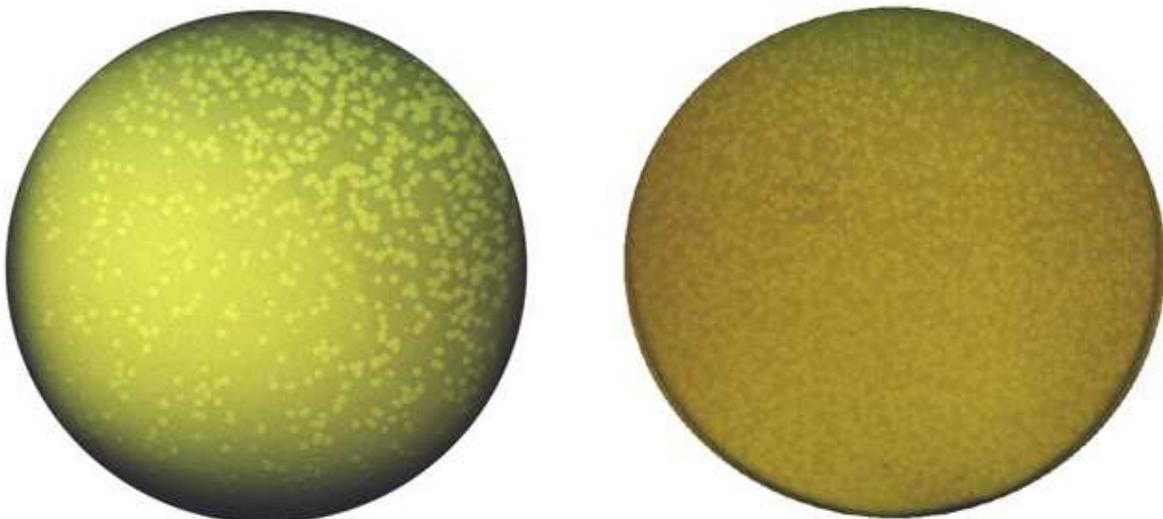


Abb. 8: Plaquemorphologie der *Myoviridae* fv 8501/2 (A, links) und fv 81-531/2/3 (F, rechts)

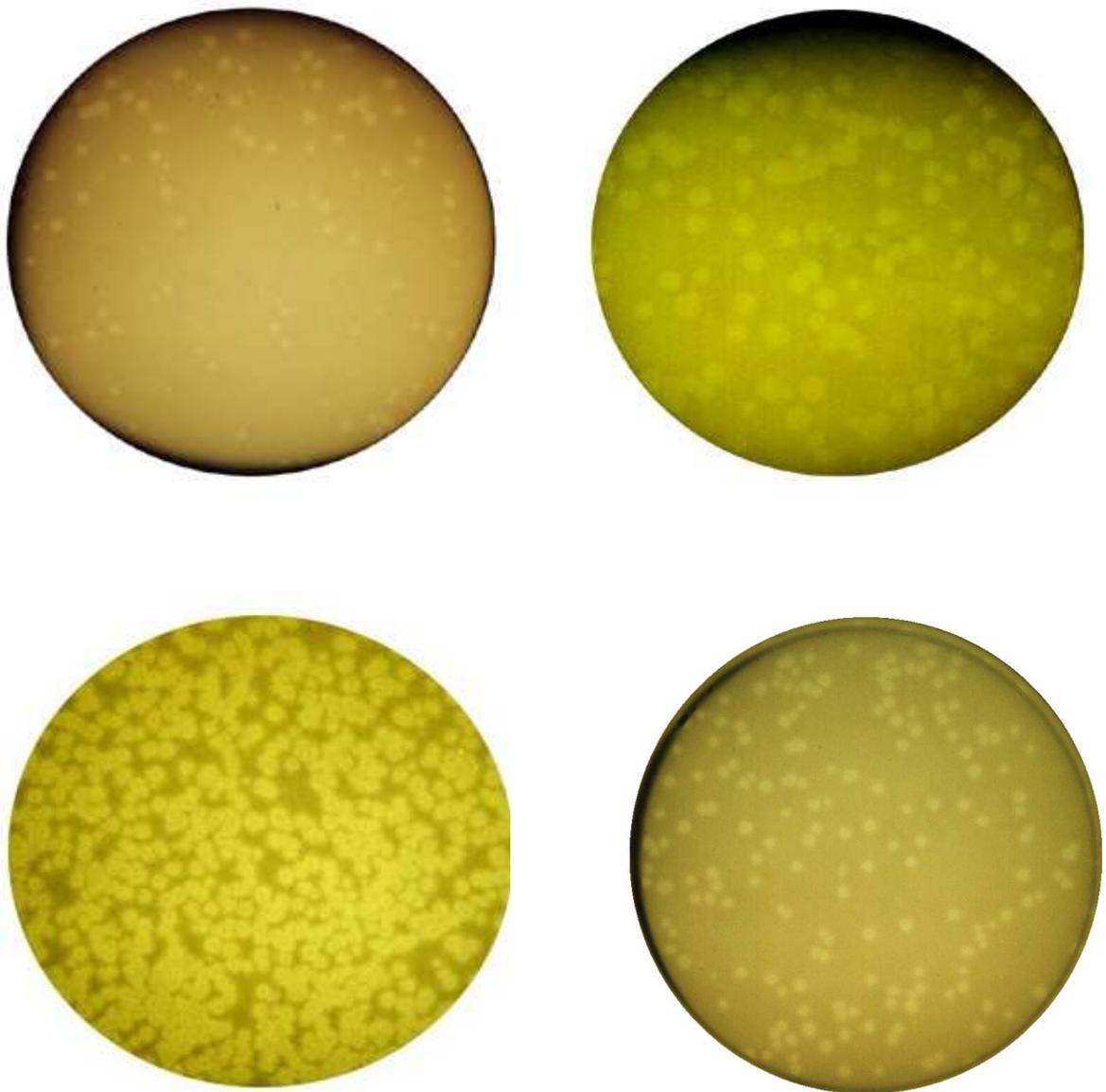


Abb. 9: Plaquemorphologie der *Podoviridae*. In der oberen Reihe sind fv 83-554/3/2 (C, links) und fv Na5 (E, rechts), in der unteren Reihe sind fv 83-554/3/3 (G, links) und fv 83-554/3/4 (I, rechts) dargestellt.

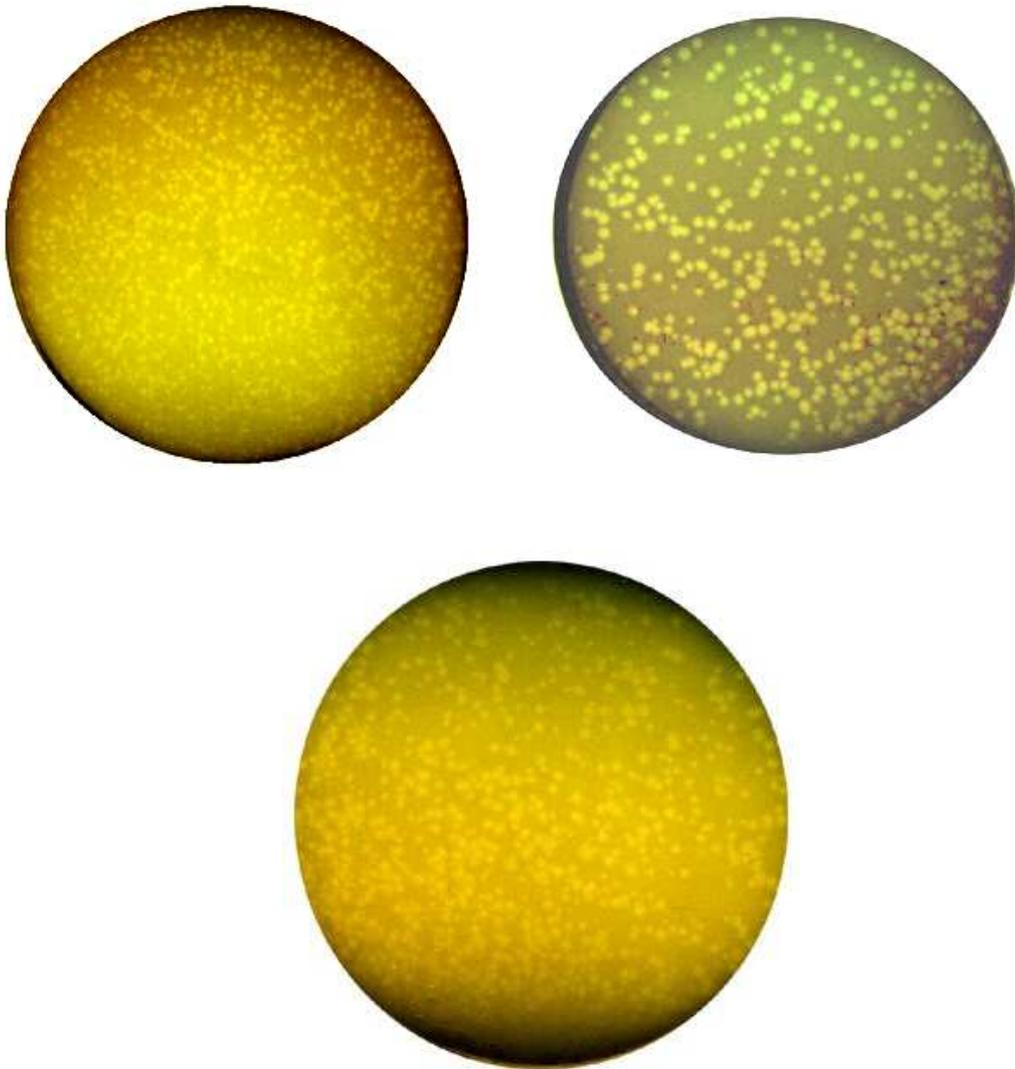


Abb. 10: Plaquemorphologie der *Siphoviridae* fv 81-531/2/2 (B, oben links), fv 8501/3 (D, oben rechts) und fv 83-680/3 (H, unten)

4.4 Chloroformresistenz

Bei der Bestimmung der Chloroformresistenz erwiesen sich alle 9 getesteten Phagen als resistent. Die Ausgangstiter der verwendeten Phagensuspensionen lagen bei Testbeginn zwischen 10^{-7} und 10^{-11} pfu/ml. Bei konstanten Lagertemperaturen von 4°C über den Testzeitraum waren bei den durchgeführten Titerbestimmungen kurz nach Chloroformzugabe sowie 3 und 6 Monate später

Tabelle 10: Ergebnisse der Bestimmung der Lysispektren von *F. varium*-Phagen (1000fache RTD) mit indolpositiven und indolnegativen Stämmen von *Fusobacterium varium* unter Berücksichtigung der Zuordnung zum Morphotyp. cl = konfluente Lysis pl=Plaques leeres Feld=keine Lysis

Stamm		<i>Myoviridae</i>				<i>Siphoviridae</i>					<i>Podoviridae</i>						Indolbild.	
		A	F	B	D	H	K	N	O	C	E	G	I	L	M			
ATCC	8501	cl	cl		cl	cl	cl	cl	cl	cl			cl	cl	cl		cl	+
VPI	2527	cl				cl			cl	cl			cl	cl	cl			+
VPI	2377	cl				cl			cl	cl			cl	cl	cl	cl	cl	+
VPI	2392	cl	cl		cl	cl	cl		cl	cl			cl	cl	cl	cl	cl	-
Li	5	cl	cl		cl		pl		cl	cl			cl	cl	cl	cl	cl	+
Na	5	cl	cl		cl	cl	cl	cl	cl	cl			cl	cl	cl		cl	+
RMA	1343	cl	cl					cl	cl	cl			cl	cl	cl	cl	cl	-
RMA	5169					cl		cl	cl					cl	cl	pl		-
RMA	6938	cl	pl										cl	cl	cl	cl	cl	-
MLU	81-531/2	cl	cl		cl	cl	cl	cl					cl	cl	cl	cl	cl	-
MLU	82-552/1	cl	cl					cl						cl	cl	cl	cl	+
MLU	83-188/2														cl	cl	cl	-
MLU	83-554/3	cl	cl		cl	cl	cl	cl		cl			cl	cl	cl	cl	cl	+
MLU	83-680/3	cl			cl	cl	cl	cl	cl	cl				cl	cl	cl		-
MLU	91-263/3	cl	cl			cl		cl	cl	cl			cl	cl	cl	cl	cl	+
MLU	91-2135/2		cl		cl	cl	cl		cl	pl				cl			pl	-
MLU	91-2296/3	cl	cl			cl		cl	cl	cl			cl	cl	cl	cl	cl	-
MLU	91-2641/1	cl	cl		cl	cl	cl	cl	cl	cl			cl	cl	cl	cl	cl	+
MLU	92-932/2		cl		cl	cl	cl	cl						cl	cl	cl	cl	-
MLU	92-1282/3	cl	cl		cl	cl	cl	cl	cl					cl	pl	pl	cl	+
MLU	98-971/3	cl						cl	cl	cl				cl	cl	cl	cl	+

Alle Stämme der Spezies *Fusobacterium varium* wurden durch mindestens einen der Phagen lysiert, allerdings zeigte das quantitative Ausmaß erhebliche Schwankungen. Mit Ausnahme der Phagen fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) sowie fv 81-531/2/2 (B) und fv 83-680/3 (H) wies letztlich keiner der Phagen ein völlig identisches Lysismuster mit einem anderen untersuchten Phagen auf, auch wenn es gewisse Ähnlichkeiten gab. So erzeugten die zu den *Podoviridae* gehörenden Phagen fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G) ein zwar sehr ähnliches aber nicht identisches Lysismuster. Die zu den *Siphoviridae* zählenden Phagen fv 81-531/2/2 (B) und fv 83-680/3 (H) zeigten ein übereinstimmendes Lysismuster. Abweichungen innerhalb desselben Morphotypes zeigte hier der Phage fv 8501/3 (D). Für die erstmals isolierten *Myoviridae* fv 8501/2 (A) und fv 81-531/2/3 (F) konnte ein weitgehend differentes Lysismuster ermittelt werden. In den Tests waren deutliche Unterschiede auch hinsichtlich der eingesetzten Lysatkonzentration in Form von zusätzlicher Lysis bei Verwendung der 1000fachen RTD zu beobachten. Innerhalb desselben Morphotypes konnten somit, auch unter Einbeziehung der

Phagen von BÖHME (16), alle Phagen außer fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) bzw. fv 81-531/2/2 (B) und fv 83-680/3 (H) durch die Unterschiedlichkeit im Lysismuster als eigene Entitäten erkannt werden. Die genannten Ausnahmen sind durch das Merkmal des Lysisspektrums nicht zu trennen.

Der Stamm MLU 91-2641/1 wurde von allen Phagen klar und kräftig lysiert, so daß er sich als universeller Indikatorstamm für *Fusobacterium varium*-Phagen anbietet.

Stämme anderer Spezies des Genus *Fusobacterium* wie *F.necrophorum*, *F.mortiferum*, *F.gonidiaformans* und 4 Stämme nicht auf Speziesebene differenzierter Fusobakterien wurden niemals lysiert, ebensowenig wie der Vertreter des Genus *Bacteroides* (*B. fragilis* HSP-40).

Bemerkenswert ist, daß auch die mitgeführten indolnegativen Stämme von *Fusobacterium varium* von verschiedenen der getesteten Phagen ebenso lysiert wurden wie die indolpositiven Stämme. Das Charakterisierungsmerkmal der Indolbildung scheint also kein Differenzierungsmerkmal innerhalb der Spezies *F.varium* zu bedeuten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es sich bei den isolierten Phagen um Isolate mit hoher Spezifität für die Spezies *Fusobacterium varium* bei differenter Stammspezifität handelt.

Gelegentlich ist in der Routinediagnostik eine eindeutige Speziesbestimmung der Fusobakterien nicht mit völliger Sicherheit möglich. Für diese Situationen bietet sich ein „Satz diagnostischer Phagen“ zur Identifizierung von Stämmen der Spezies *Fusobacterium varium* an. Dieser sollte aus den Phagen fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G) bestehen, da beide zusammen alle getesteten Stämme von *F.varium* lysierten.

4.6 DNS-Analysen

Die DNS der neun Phagen wurde wie unter 3.3.1 beschrieben isoliert und einer Restriktionsanalyse unterzogen (siehe Kapitel 3.3.2). Die Analysen zeigten, daß die DNS in unterschiedlichen Mustern von 4 der 5 verwendeten Restriktionsendonukleasen geschnitten wurde. Ein für die Auswertung gut verwertbares Bandenmuster ergab sich jedoch nur für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *Hind III*. Für die meisten der durchgeführten Restriktionsansätze zeigte sich, daß nur ein Teil der DNS verdaut wurde. Es waren Banden hohen Molekulargewichtes in Nähe der Auftragungstasche zu erkennen, die unverdauter DNS entsprechen dürften. Alle Restriktionsansätze wurden im Verlauf der Arbeit mehrfach durchgeführt. Dabei zeigten insbesondere die Ansätze mit *Ava I* ein Bandenmuster, in dem die einzelnen Banden kaum gegeneinander abgrenzbar waren.

Restriktionsansätze mit *Hinf I* zeigten trotz mehrerer Versuche eine offenbar unvollständige Verdauung. So waren bei elektrophoretischer Auftrennung am Anfang der Laufstrecke, d.h. im

höhermolekularen Bereich, einzelne Banden klar zu erkennen, während sich im niedermolekularen Bereich eine wirklich klare Trennung der Nukleinsäurefragmente als unmöglich erwies. Der Vollständigkeit halber sind die Ergebnisse dieser Versuche im folgenden mit dargestellt. Nach Restriktion mit *Hinf*I zeigte sich das Bandenmuster von fv 83-554/3/3 (G) mit dem von fv 83-554/3/4 (I) identisch, wobei sich diese beiden Phagen auch in allen anderen Charakterisierungsmerkmalen als übereinstimmend und damit als identisch erwiesen. Innerhalb desselben Morphotypes gab es nach Restriktion mit *Hinf* I sonst keine weiteren identischen Bandenmuster, lediglich bei den zu den *Siphoviridae* gehörenden Phagen fv 81-531/2/2 (B) und fv 83-680/3 (H) sowie den unterschiedlichen Morphotypen zugehörigen fv 8501/2 (A) und fv 83-554/3/2 (C) lagen die sichtbaren Banden dicht benachbart.

Da die Restriktionsversuche mit *Sau*3AI parallel zu denen mit anderen Enzymen, d.h. an derselben DNS-Probe und somit gleicher Ausgangskonzentration erfolgte, und diese anderen Enzyme verwertbare Ergebnisse lieferten, schien *Sau*3AI die DNS der isolierten Phagen nicht hinreichend zu verdauen. Wie bei *Hinf*I waren auch hier lediglich einzelne Banden erkennbar. Bei hinreichender Aussagekraft bezüglich der näheren Charakterisierung der Phagen mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Hind* III, die klare Ergebnisse lieferten, wurde dieses Enzym aus dem genannten Grund ebenfalls nicht weiter verwendet. Die Anzahl der erhaltenen Einzelbanden mit *Hinf*I und *Sau*3AI sind in den Tabellen 11 und 12 dargestellt.

Tabelle 11: Erkennbare Einzelbanden nach Restriktion der Phagen-DNS mit *Hinf*I

Phage	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Banden	3	5	3	4	3	4	3	5	3

Tabelle 12: Erkennbare Einzelbanden nach Restriktion der Phagen-DNS mit *Sau*3AI

Phage	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Banden	1	1	2	1	1	1	2	1	2

Die Tabellen 13 und 14 zeigen die Anzahl erhaltener Banden und die gerundeten Größenangaben in Basenpaaren nach Verdauung der DNS der 9 isolierten Bakteriophagen mit *Eco*RI und *Hind* III. Dabei wurde der Zuordnung der Phagen zu den drei unterschiedlichen Morphotypen bereits Rechnung getragen. Analog dazu sind in den Abbildungen 11 und 12 die Gele dargestellt. Dabei sei betont, daß die fotografische Dokumentation der erhaltenen Agarosegele insbesondere in Bezug auf die Sichtbarkeit nur schwach unter dem Transilluminator fluoreszierender Banden trotz wiederholter Durchführungen der Elektrophoresen nur ungenügend gelang. Mit dargestellt ist der Phage fv 83-554/3/4 mit dem Kürzel I, der im Rahmen einer zunächst vermuteten plaquemorphologischen Unterschiedlichkeit aus einer EPA des Phagen fv 83-554/3/3 (G) im

Weiteren separat geklont, vermehrt und in den Untersuchungen mitgeführt wurde. Hierbei konnte die Identität der beiden Phagen fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) bewiesen werden, bei den vorliegenden DNS-Analysen lieferten beide Phagen bei jeder der verwendeten Restriktionsendonukleasen jeweils übereinstimmende Bandenmuster.

Alle anderen Bakteriophagen wiesen selbst innerhalb desselben Morphotypes sowohl für *EcoRI* als auch *Hind* III distinkte Ergebnisse auf, d.h. keiner der Phagen zeigte sich mit einem anderen identisch. Somit sind außer fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) alle anderen isolierten Phagen zumindest in Bezug auf das Charakterisierungsmerkmal der DNS-Analyse als eigene Entitäten anzusehen. Es gab lediglich Übereinstimmungen bei einzelnen Banden bzw. es lagen Einzelbanden dicht benachbart, eine verwandtschaftliche Beziehung der Phagen untereinander ist somit anzunehmen. Eine Gruppeneinteilung wie in der Arbeit von BÖHME (16) war nicht möglich. In der Tabelle 14 ist die Zahl identischer Banden zwischen den einzelnen Phagen am Ende der Tabelle mit dargestellt. Im einzelnen ist dies nach Restriktion mit *EcoRI* die für die *Podoviridae* fv 83-554/3/2 (C) und fv 83-554/3/3 (G) bzw. fv 83-554/3/4 (I) identische Bande bei 2530 bp, dagegen hatten fv Na5 (E), fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) die bei 6270 bp gelegenen Bande gemeinsam. Bei den Vertretern der *Siphoviridae* und *Myoviridae* gab es nach Verdauung durch *EcoRI* keine Banden gleicher Größe. Nach Restriktion mit *Hind* III zeigten die *Myoviridae* fv 8501/2 (A) und fv 81-531/2/3 (F) eine einzige gemeinsame Bande bei 4885 bp. Für die zu den *Podoviridae* zählenden fv 83-554/3/2 (C) und fv Na5 (E) gab es Fragmente gleicher Größe bei 7285 und 2495 bp, für fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G) bzw. fv 83-554/3/4 (I) bei 1275 und 2035 bp. Alle weiteren Fragmente wiesen jeweils unterschiedliche Größen auf.

Interessanterweise liegen die Fragmente derjenigen Phagen, die zum Morphotyp der *Myoviridae* gehören, also fv 8501/2 (A) und fv 81-531/2/3 (F), nach Verdauung mit *Hind* III sämtlich in einem ähnlichen Bereich zwischen 1010 und 4885 bp, wobei aber als wesentlich festzuhalten ist, daß es außer der gemeinsamen Bande bei 4885 bp keine weiteren identischen Banden gibt. Desweiteren wird die DNS beider Phagen durch *Hind* III in dieselbe Anzahl Fragmente (10) zerlegt. Diese beiden Phagen zeigen sich somit in der Sequenz ihrer Nukleinsäuren zwar offenbar sehr ähnlich und damit nahe verwandt, aber nicht identisch und somit eigenständig. Auch nach Restriktion mit *EcoRI* lagen die Banden beider Phagen in ähnlichen Bereichen (2500-21320 bp), jedoch weniger deutlich als nach Verdauung mit *Hind* III. Es zeigten sich auch bei *EcoRI* jeweils unterschiedliche Einzelbanden, was die eigenen Entitäten der Phagen belegt. Dabei könnte die Bande des Phagen fv 81-531/2/3 (F) bei 21320 bp einem Anteil unverdauter DNS entsprechen, zumal die Summe der erkennbaren Fragmente desselben Phagen nach Restriktion mit *Hind* III in diesen Bereich fällt (24235 bp).

Die Vertreter der morphologischen Gruppe der *Podoviridae* wurden nach Restriktion mit *Hind* III in die meisten Einzelfragmente (14-15) zerlegt. Der Großteil der Banden entsprach einer Größe zwischen 820 und 13020 bp. Auch nach Behandlung mit *Eco* RI zeigten die *Podoviridae*-Vertreter die meisten Banden (6-10). Am unterschiedlichsten waren die Ergebnisse bei denjenigen Bakteriophagen, die zur großen morphologischen Gruppe der *Siphoviridae* zählen. Hier zeigte sich nicht nur die geringste Anzahl der Einzelfragmente bei beiden Restriktionsendonukleasen (1-4 bzw. 1-9), auch die Fragmentgrößen variierten deutlicher.

Bei der Bestimmung der Genomgröße, normalerweise durch die Summation der Einzelfragmente nach Restriktion mit der betreffenden Endonuklease ermittelt, traten erwartungsgemäß Schwankungen auf. Die Größe des Gesamtgenoms wurde somit als Spanne angegeben. Betrachtet man orientierend die erhaltenen Summen der Einzelbandengrößen, liegen diese etwa zwischen 24 und 80 kb, in der Mehrzahl allerdings zwischen 43 und 62 kb. Dabei zeigt sich vor allem die Summe der Fragmente bei den *Myoviridae* sowohl nach Restriktion mit *Eco*RI als auch mit *Hind* III als dicht beieinander gelegen (26110 und 24235 kb bzw. 43285 und 43670 kb).

Hind III zerlegte die Nukleinsäuren der Phagen in Bruchstücke mit Größen zwischen 49335 und 820 Basenpaaren, wobei der Wert 49335 bp letztlich der unverdauten DNS des Phagen fv 8501/3 (D) zuzuordnen ist. Der Großteil aller Fragmente bewegte sich in Größenordnungen zwischen etwa 820 und 15745 bp. Dies entspricht ähnlichen Angaben wie bereits in anderen Arbeiten erhoben, beispielsweise von BÖHME (16) (hier 730 bis 11100 bp). Die Versuche mit *Eco*RI ergaben, abgesehen von der offenbar unverdauten DNS des Phagen fv 81-531/2/2 (B), die eine Größe von 25000 bp zeigte, Restriktionsfragmente zwischen 1000 und maximal 38170 bp, wobei jedoch der größte Teil etwa zwischen 1000 und 11000 bp lag. Auch diese Werte entsprechen ungefähr den bereits für andere Bakteriophagen mit Spezifität für *F. varium* erhobenen Ergebnissen (16). Inwieweit es sich bei den Banden im hochmolekularen Bereich um ungeschnittene DNS oder um wirkliche große Fragmente handelt, bleibt unklar. Jedoch ist bei alleiniger Darstellung dieser Bande wie bei dem Phagen fv 81-531/2/2 (B) von einer Unverdaubarkeit gegenüber dieser Restriktionsendonuklease auszugehen, d.h. daß die restriktionsendonukleasenspezifische Schnittstelle nicht enthalten ist. Insbesondere beim Phagen fv 8501/3 (D) entspricht die einzeln zur Darstellung kommende Bande bei ca. 49335 bp etwa der Summe der Fragmente nach Restriktion mit *Hind* III (58100 bp). Beide Phagen gehören bemerkenswerterweise zum gleichen Morphotyp der *Siphoviridae*.

Tabelle 13: Ergebnisse der Restriktionsanalyse der Phagen-DNS mit Eco RI – Darstellung der Banden mit Unterteilung gemäß Morphotyp, Größenangaben in Basenpaaren (bp) mit Summenangabe

Morphotyp	<i>Podoviridae</i>				<i>Siphoviridae</i>			<i>Myoviridae</i>	
Phagenkürzel	C	E	G	I	B	D	H	A	F
Größe der	20460	18380	16555	16555	25000	24000	38170	16140	21320
Restriktions-	11000	9560	6270	6270		14000	16140	8545	9265
Fragmente	9265	7205	5400	5400		10500	4200	7015	7545
	2530	6270	4652	4652		9600		6270	2940
	1500	3015	4000	4000				2815	2600
	1000	2555	3390	3390				2500	
		1040	3135	3135					
			2530	2530					
			1851	1851					
			1530	1530					
Bandenzahl insgesamt	6	7	10	10	1	4	3	6	5
Summe	45755	48025	49313	49313	25000	58100	58510	43285	43670

Tabelle 14: Ergebnisse der Restriktionsanalyse der Phagen-DNS mit Hind III – Darstellung der Banden mit Unterteilung gemäß Morphotyp, Größenangaben in Basenpaaren (bp) mit Summenangabe

Morphotyp	<i>Podoviridae</i>				<i>Siphoviridae</i>			<i>Myoviridae</i>	
Phagenkürzel	C	E	G	I	B	D	H	A	F
Größe der	13020	32050	10490	10490	38420	49335	15745	4885	4885
Restriktions-	10490	10930	7525	7525	21500		10490	4005	3615
Fragmente	7285	7285	6270	6270	12450		8645	3450	3060
	5110	4400	4780	4780	7060		6095	3015	2740
	4580	3675	4235	4235			4580	2665	2495
	3740	3245	3060	3060			3800	2220	2140
	3440	2810	2560	2560			2975	1755	1650
	2890	2495	2035	2035			2400	1590	1425
	2495	2035	1710	1710			2110	1340	1215
	2110	1650	1425	1425				1185	1010
	1795	1495	1275	1275					
	1530	1275	1130	1130					
	1310	1115	1025	1025					
	1170	920	865	865					
	1060	820							
Zahl identischer Banden	zu E: 2 zu G: 0	zu C: 2 zu G: 2	zu C: 0 zu E: 2	zu C: 0 zu E: 2	zu D: 0 zu H: 0	zu B: 0 zu H: 0	zu B: 0 zu D: 0	zu F: 1	zu A: 1
Bandenzahl insgesamt	15	15	14	14	4	1	9	10	10
Summe	62025	76200	48385	48385	79430	49335	56840	26110	24235

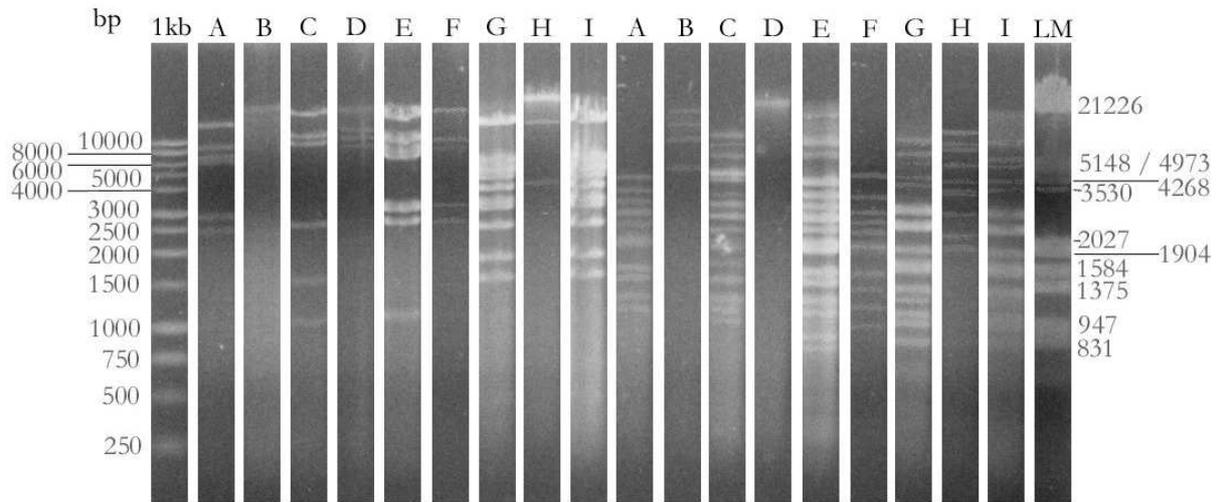


Abb. 11: Bandenmuster der Bakteriophagen-DNS nach Restriktion mit *EcoRI* (links, A-I) und *Hind III* (rechts, A-I) nach Auftrennung im 1% Agarose-Gel, Größenangaben in Basenpaaren (bp), 1kb=1kb-ladder, LM=Lambda-Marker

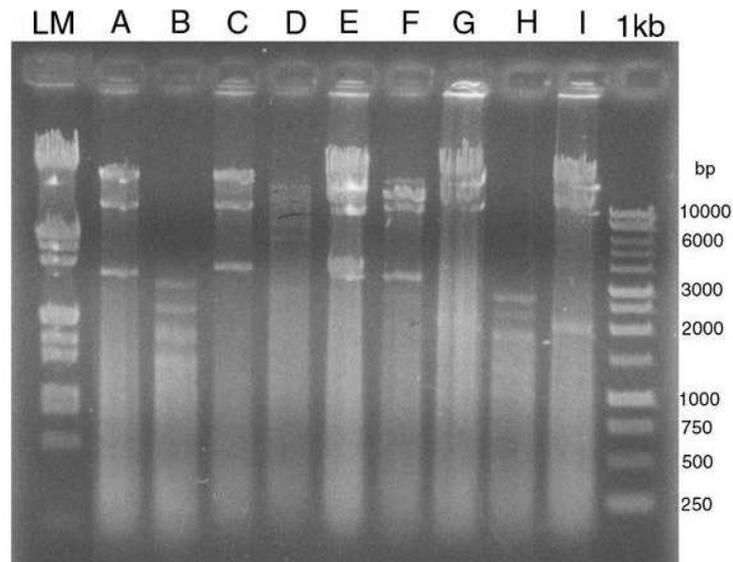


Abb. 12: Bandenmuster der Bakteriophagen-DNS nach Restriktion mit *HinfI* nach Auftrennung im 1% Agarose-Gel
Größenangaben in Basenpaaren (bp), 1kb=1kb-ladder, LM=Lambda-Marker

4.7 Analyse der Strukturproteine

Bei der Auswertung der Polyacrylamid-Gele war zu erkennen, daß bei den neun isolierten Phagen einzelne Banden besonders stark ausgeprägt waren, die aus diesem Grund als Hauptproteine angesehen werden können. Aufgrund der morphologischen Struktur mit dem aus multiplen

Kapsomeren aufgebauten icosaedrischen Kopf ist die Zuordnung der Hauptbanden zu Strukturproteinen des Kopfes anzunehmen. Eine sichere Unterscheidung zwischen Kopf- und Schwanzproteinen der Phagen war leider nicht möglich, dies hätte eine vorherige Trennung dieser Strukturanteile notwendig gemacht.

Innerhalb der durch den Morphotyp vorgegebenen Einteilung zeigten alle Phagen ein differierendes Bandenmuster. Eine Ausnahme waren wiederum die Phagen fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I), die wie bereits bei den Restriktionsanalysen ein identisches Ergebnis zeigten. Bei den morphologisch den *Podoviridae* angehörenden Phagen gab es einzelne identische Nebenbanden, so hatten z.B. die Phagen fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G) bzw. fv 83-554/3/4 (I) die Banden bei 78 und 128 kDa gemeinsam. Bei 45 kDa kam eine gemeinsame Bande der Phagen fv 83-554/3/2 (C) und fv 83-554/3/3 (G) bzw. fv 83-554/3/4 (I) zur Darstellung. Bei den *Siphoviridae* war lediglich das Fragment bei 128 kDa den Phagen fv 8501/3 (D) und fv 83-680/3 (H) gemeinsam, ebenso wie bei den *Myoviridae* fv 8501/2 (A) und fv 81-531/2/3 (F), die ebenfalls eine einzige identische Bande bei 43 kDa zeigten. Dabei war diese bei fv 81-531/2/3 (F) als Haupt-, bei fv 8501/2 (A) als Nebenbande zu klassifizieren. Weitere Banden der Bakteriophagen zeigten sich, jeweils innerhalb desselben Morphotyps, zwar dicht benachbart aber nicht identisch. So lagen bei fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G) 3 weitere Banden mit 32,5 bzw. 34, 43 bzw. 45 und 64 bzw. 66 kDa dicht beieinander.

Die meisten Hauptbanden kamen im Bereich zwischen 39 und 49 kDa (der Phage fv 81-531/2/3 mit 2 Hauptbanden) zur Darstellung. Nur die Phagen fv 8501/2 (A) und fv 8501/3 (D) zeigten eine weitere Hauptbande im höhermolekularen Bereich (61 bzw. 55 kDa). Die Anzahl erhaltener Einzelbanden der Phagen schwankte zwischen 3 und 11, die wenigsten zeigte der Phage fv 83-554/3/2 (C) mit nur insgesamt 2 Banden. Eine zusammenfassende Darstellung der Phagenproteine zeigt Tabelle 15 und die Abbildung 13.

Zusammenfassend stellen somit auch in Bezug auf das Charakterisierungsmerkmal der Strukturproteinanalyse alle Phagen offenbar eigene Entitäten dar, mit Ausnahme von fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I), die sich wiederum identisch zeigten. Dieses Ergebnis geht mit dem der DNS-Analyse konform.

Die Tabellen 16 bis 18 geben unter Berücksichtigung aller untersuchten Merkmale einen Überblick über Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den einzelnen isolierten Phagen. Dabei sind die einzelnen Morphotypen getrennt dargestellt. Für die Vergleiche hinsichtlich des Lysisspektrums wurden dabei die Ergebnisse mit der einfachen RTD herangezogen.

Tabelle 15: Ergebnisse der SDS-PAGE der Phagenproteine – Darstellung der Banden in Haupt- (zur Verdeutlichung fett gedruckt) und Nebenbanden mit Unterteilung gemäß Morphotyp, Größenangaben in kDa, vergleichbare Größen wurden auf eine Zeile gesetzt

Morphotyp	<i>Podoviridae</i>				<i>Siphoviridae</i>			<i>Myoviridae</i>	
Phagenkürzel	C	E	G	I	B	D	H	A	F
Bandengröße (in kDa)		128	128	128		128	128	138	
			84	84		110		85	
		78	78	78		65	67	71	
			71	71	54	55		61	
		64	66	66	45	44	49	45	47
		57			37	39		43	43
	45	43	45	45		31		42	
	42	41						39	38
		39						34	
		32,5	34	(34)				33,5	
		32						30	
Bandenzahl insgesamt	2	9	7	7	3	7	3	11	3
Davon Hauptb.	1	1	1	1	1	2	1	2	2
Davon Nebenb.	1	8	6	6	2	5	2	9	1

Tabelle 16: Vergleich der übereinstimmenden bzw. differierenden Merkmale der *Podoviridae* einschließlich der bereits von BÖHME (16) und HÖHNE et al. (44) beschriebenen Phagen L und M. Beim Auftreten gemeinsamer Merkmale zwischen einzelnen Phagen wurde dies durch große Buchstaben ausgedrückt, bei fehlenden Gemeinsamkeiten durch kleine Schreibweise

Merkmal	Phage C (fv 83-554/3/2)	Phage E (fv Na5)	Phage G (fv 83-554/3/3)	Phage L (fv 81-531/2)	Phage M (fv 83-554/3)
Plaquemorphologie	e g l m	c G l m	c E l m	c e g M	c e g L
Lysisspektrum	e g l m	c g l m	c e l m	c e g m	c e g l
Genomgröße	e g l m	c g l m	c e l m	c e g M	c e g L
Restriktionsanalyse	e g l m	c g l m	c e l m	c e g M	c e g L
Strukturproteine	e g l m	c g l m	c e l m	c e g M	c e g L

Tabelle 17: Vergleich der übereinstimmenden bzw. differierenden Merkmale der *Siphoviridae* einschließlich der bereits von BÖHME (16) und HÖHNE et al. (44) beschriebenen Phagen K, N und O. Beim Auftreten gemeinsamer Merkmale zwischen einzelnen Phagen wurde dies durch große Buchstaben ausgedrückt, bei fehlenden Gemeinsamkeiten durch kleine Schreibweise

Merkmal	Phage B (fv 81-531/2/2)	Phage D (fv 8501/3)	Phage H (fv 83-680/3)	Phage K (fv 8501)	Phage N (fv 2377)	Phage O (fv 2527)
Plaue- morphologie	d h k N O	b h k n o	b d k n o	b d h n o	b d h k O	b d h k N
Lysisspektrum	d H k n o	b h K n o	B d k n o	b D h n o	b d h k o	b d h k n
Genomgröße	d h N O	b N O ähnlich H	b n o ähnlich D	keine Aussage	B d h O	B d h N
Restriktions- analyse	d h n o	b h n o	b d n o	keine Aussage	b d h O	b d h N
Strukturproteine	d h n k o	b h n k o	b d n k o	b d h n o	b d h k O	b d h k N

Tabelle 18: Vergleich der übereinstimmenden bzw. differierenden Merkmale der *Myoviridae*. Beim Auftreten gemeinsamer Merkmale zwischen einzelnen Phagen wurde dies durch große Buchstaben ausgedrückt, bei fehlenden Gemeinsamkeiten durch kleine Schreibweise

Merkmal	Phage A (fv 8501/2)	Phage F (fv 81-531/2/3)
Plaquemorphologie	f	a
Lysisspektrum	f	a
Genomgröße	vergleichbar	vergleichbar
Restriktionsanalyse	f	a
Strukturproteine	einzelne Banden vergleichbar	einzelne Banden vergleichbar

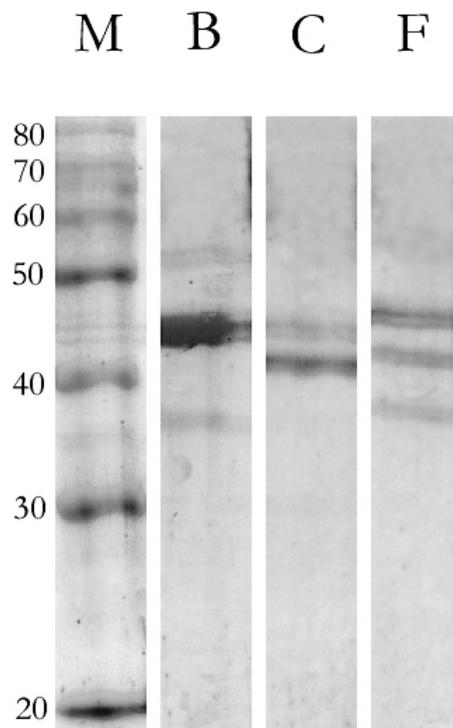
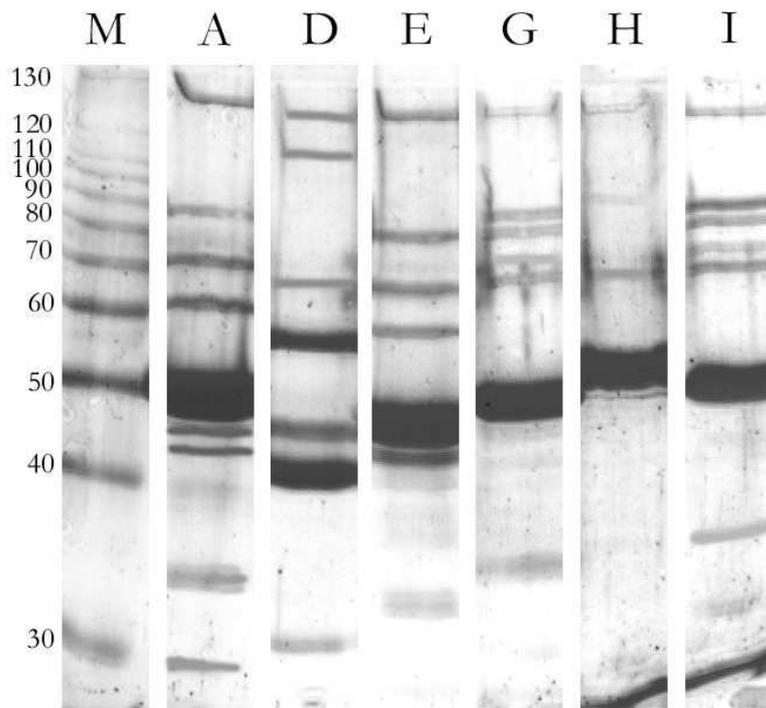


Abb 13: Darstellung der Strukturproteine der Phagen im 12% reduzierenden SDS-Gel

Obere Abbildung: Phagen A, D, E, G, H und I; Untere Abbildung: Phagen B, C und F

M = Marker, Größenangaben jeweils in kDa

5 Diskussion

Obligat anaerobe, gramnegative sporenlose Stäbchen des Genus *Fusobacterium* sind wichtige Erreger endogener pyogener Infektionen (14, 20, 29, 50, 57, 66), sie wurden erstmals im 19. Jahrhundert beschrieben (14). Anaerobe Bakterien sind Teil der normalen bakteriellen Flora des Menschen, dabei finden sich Fusobakterien z.B. auf der Schleimhaut des Mundes, haben aber normalerweise keinen Hauptanteil an der faekalen oder vaginalen Flora (14). *Fusobacterium varium* gehört zur normalen Flora des Darmes und wurde als Verursacher intraabdomineller, pleuropulmonaler inklusive oraler und dentaler Infektionen, bei Weichteilinfektionen (auch am Auge) sowie bei Knochen- und Gelenkentzündungen gefunden. Im Gegensatz zu anderen Vertretern des Genus *Fusobacterium* wird *F. varium* eher nicht bei Infektionen des ZNS, der ableitenden Harnwegen oder bei Septikämien gefunden. Dabei stellen die Fusobakterien meist Teil einer Mischinfektion mit anderen anaeroben oder auch aeroben Keimen dar.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist das Wissen über Bakteriophagen mit Spezifität für obligat anaerobe gramnegative Stäbchen noch begrenzt. Die meisten Publikationen beziehen sich auf Phagen mit Spezifität für das Genus *Bacteroides* (15, 19, 21, 23, 24, 31, 49, 52, 55, 58, 59, 63, 67, 72, 73, 74). Phagen mit Spezifität für Bakterien des Genus *Fusobacterium* sind nur von HUET und THOUVENOT 1964 (45), BRADLEY (17), TAMADA et al. 1985 (69), ANDREWS et al. 1997 (10) und BÖHME (16) bzw. HÖHNE et al. (44) näher beschrieben worden, und zwar mit Spezifität für *F. varium* und *F. necrophorum*. Für weitere Spezies der Gattung *Fusobacterium* gelang bisher kein Phagennachweis.

In dieser Arbeit konnten 9 unterschiedliche Bakteriophagen aus 2 Abwasserproben isoliert werden, davon ein Phage mit Spezifität für *Bacteroides fragilis*, die anderen waren ausnahmslos spezifisch für *F. varium*. Für andere Spezies der Gattung *Fusobacterium* gelang kein Phagennachweis. (siehe Kapitel 4.1) Ein weiterer Phage wurde im Rahmen einer vermuteten plaquemorphologischen Unterschiedlichkeit aus einer EPA des Phagen fv 83-554/3/3 (G) im Weiteren mitgeklont und vermehrt, so daß insgesamt 10 Phagen gefunden wurden.

Dabei umfassten die Isolierungsversuche neben *F. varium* und *F. necrophorum* als Vermehrungswirte auch Stämme von *F. mortiferum*, *F. gonidiaformans* und 2 Stämme nicht auf Speziesebene identifizierter Fusobakterien.

Die Bezeichnung der isolierten Phagen erfolgte in Anlehnung an ACKERMANN mit den Abkürzungen der Stamminitalen des Vermehrungsstammes sowie der Stammzahl als fv 8501/2, fv 8501/3, fv 81-531/2/2, fv 81-531/2/3, fv 83-554/3/2, fv 83-554/3/3, fv Na5 und

fv 83-680/3. Zur Vereinfachung wurden den Phagen im Rahmen dieser Arbeit Großbuchstabenkürzel in alphabetischer Folge zugewiesen (siehe Tabelle 5).

Als Isolierungsmethode diente ein Originalanreicherungsverfahren, mit dem bei Phagenkonzentrationen bis 1pfu/40ml ein Nachweis dieser Phagen möglich ist.. Bezüglich der Anreicherungstechniken gibt es zum heutigen Zeitpunkt umfangreiche Untersuchungen (25, 31, 59, 60, 73) mit zum Teil unterschiedlichen Ergebnissen. In dieser Arbeit wurde bewusst die in unserem Institut bereits bewährte und relativ einfach durchzuführende Methode beibehalten.

Die weitere Charakterisierung der isolierten Phagen erfolgte anhand der Ultrastruktur mittels Elektronenmikroskopie, Plaquemorphologie, Lysisspektrum, Chloroformresistenz sowie Untersuchung von DNS und Strukturproteinen.

5.1 Phagenmorphologie

Morphologisch wurden Vertreter der *Siphoviridae* und *Podoviridae* für Phagen gramnegativer anaerober Bakterienspezies bereits beschrieben. Näher untersucht sind vor allem Phagen für verschiedene *Bacteroides*-Spezies. Es dominieren dabei morphologisch Vertreter des Typs B nach BRADLEY (*Siphoviridae*), d.h. Phagen mit isometrischem Kopf und langem flexiblen, aber nicht kontraktilem Schwanz. In einer ausführlichen Studie von BOOTH et al. (15) entfielen 65 von 68 Isolaten auf diesen Morphotyp, die restlichen drei Isolate waren *Myoviridae*. Auch BRANDIS et al. (19), KELLER und TRAUB (52), KORY und BOOTH (55) sowie BURT und WOODS (21, hier *B.thetaiotaomicron*) beschrieben Phagen, die morphologisch den *Siphoviridae* angehören.

Beschreibungen über Bakteriophagen spezifisch für Bakterien der Gattung *Fusobacterium* sind derzeit in der Literatur nur vereinzelt zu finden. So fand BÖHME 1996 (16) 5 Phagen mit Spezifität für *F.varium* in Abwasserproben. Vorher gelang es HUET und THOUVENOT (45) - noch vor der ersten Beschreibung eines Phagen mit Spezifität für *Bacteroides* - im Jahre 1964 einen Phagen zu isolieren, der später als Phage 277 von BRADLEY (17) näher untersucht wurde. Dieser Phage gehörte mit seinem isometrischen Kopf und dem kurzen, nicht kontraktilem Schwanz dem Morphotyp der *Podoviridae* bzw. dem Typ C nach BRADLEY an (6, 18).

Die Publikation von TAMADA et al. (69) von 1985 betrifft die Isolierung eines Phagen mit Spezifität für die Spezies *Fusobacterium necrophorum*. Der als Phage Fn P1 benannte Bakteriophage zeigte neben dem isometrischen Kopf einen langen, kontraktilem Schwanz, was ihn somit dem Morphotyp A nach BRADLEY (18) bzw. den *Myoviridae* (6) zuordnet. Dieser Bakteriophage ist auch bis heute der einzige für *F.necrophorum* spezifische Phage geblieben. Angesichts des Überwiegens von Vertretern der *Siphoviridae* bei *Bacteroides* fällt die Zugehörigkeit der 1964 und 1985 für *Fusobacterien* isolierten Phagen zu den anderen beiden Morphotypen auf.

BÖHME (16) beschrieb *F.varium*-spezifische Bakteriophagen, die den *Podoviridae* oder *Siphoviridae* zugehörig waren. Diese Beschreibung von Vertretern der *Siphoviridae* mit Spezifität für *F.varium* war zu diesem Zeitpunkt die erste ihrer Art. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellte sich somit die Frage, ob insbesondere auch Vertreter des dritten Morphotypes, der *Myoviridae*, für Spezies von *Fusobacterium* gefunden werden könnten.

Bei den elektronenoptischen Untersuchungen der isolierten Phagen stellten sich fv 81-531/2/2 (B), fv 8501/3 (D) und fv 83-680/3 (H) als Vertreter der erstmals von BÖHME (16) für *F.varium* nachgewiesenen *Siphoviridae* dar. Dagegen gehörten fv Na5 (E), fv 83-554/3/2 (C) und fv 83-554/3/3 (G) zu den länger bekannten *Podoviridae*. Zwei der Phagen zeigten jedoch neben den isometrischen Köpfen einen langen, nicht flexiblen, dicken und damit wahrscheinlich kontraktilen Schwanz mit Querstreifung und somit morphologische Zugehörigkeit zu den *Myoviridae*. Dies ist nach der vorliegenden Literatur die erste Beschreibung von Bakteriophagen dieses Morphotypes mit Spezifität für *F.varium*. Dabei wurden beide Phagen aus unterschiedlichen Abwasserproben isoliert.

Bei einigen Phagen konnten einzelne Merkmale wie beispielsweise das Vorhandensein von *spikes* oder Bodenplatten auch bei Betrachtung mehrerer Einzelphagen nicht mit hinreichender Sicherheit geklärt werden.

Für die beiden Vertreter der *Myoviridae* fv 8501/2 (A) und fv 81-531/2/3 (F), für die bezüglich der den Morphotypen zugeordneten Eigenschaften eine Kontraktilität des Schwanzes zu erwarten ist, wären für zukünftige Untersuchungen eine Darstellung des Anheftungsvorganges und der Schwanzkontraktion eine Bestätigung der in dieser Arbeit getroffenen Zuordnung. Eine derartige Darstellung gelang bereits 1974 FOGLESONG et al. (30). Dort konnten morphologisch ebenfalls den *Myoviridae* zugehörige Phagen mit Spezifität für *Fusobacterium symbiosum* (heute: *Clostridium symbiosum*) in der Phase der Anheftung und Nukleinsäureinjektion fotografisch festgehalten werden. Versuche der Plaqueformation auf dem Wirtstamm gelangen FOGLESONG et al. (30) damals nicht.

5.2 Phagenstabilität und Chloroformresistenz

Alle getesteten Phagen erwiesen sich bei den Untersuchungen über einen Zeitraum von einem halben Jahr hinweg mit nahezu unveränderten Titern der Phagenlysate als chloroformresistent. Angaben zur Chloroformresistenz in der Literatur (5) variieren erheblich. Titerkontrollen werden für Zeiträume zwischen Minuten und 1 Jahr empfohlen. Bezüglich der Chloroformresistenz von *Fusobacterium varium*-Phagen sind außer bei BÖHME (16) keine Angaben zu finden. Bei Phagen mit Spezifität für *Bacteroides* gibt es ebenfalls deutliche Schwankungen. TARTERA (72) stellte für

25 Phagen mit Spezifität für *Bacteroides fragilis* eine weitgehende Chloroformresistenz fest. Im Gegensatz dazu zeigt eine andere Publikation von KORY und BOOTH (55) von 1986 einen nahezu subtotalen Titerabfall von fünf *Bacteroides*-Phagen bereits nach kurzer Chloroformexposition.

Die Chloroformstabilität der Phagen dieser Arbeit deutet somit auf das Fehlen von Lipiden bzw. einer Virushülle hin, was bei Phagen dieser Spezifität und diesen Morphotyps bereits beschriebenen Angaben entspricht (2, 6, 16).

Die Zugabe von Chloroform kann, bewiesene Chloroformresistenz der Phagen vorausgesetzt, prinzipiell auch als Schutz vor bakterieller Kontamination der Lysate verwendet werden (7).

Hervorzuheben sei auch die Lagerungsstabilität aller isolierter Phagen. Dabei war eine hohe Titerstabilität bereits bei Lagerungstemperaturen von 4°C zu verzeichnen. Über den Zeitraum eines halben Jahres ergaben entsprechende Titerkontrollen keinen nennenswerten Konzentrationsverlust. Die Daueraufbewahrung aller Lysate erfolgte jedoch bei -72°C, wobei ein Teil der Lysate vorher mit 87% Glycerol versetzt wurde (siehe 3.2.5). Hier konnten alle Phagen aus den gefrorenen Proben auch nach 1 Jahr wieder vermehrt werden, und zwar sowohl aus den eingefrorenen Lysaten mit als auch aus denen ohne Glycerolzusatz. Die Chloroformresistenz und hohe Lagerungsstabilität stimmt mit den bei BÖHME (16) für *F. varium*-Phagen gefundenen Ergebnissen überein.

5.3 Plaquemorphologie

Bei der Untersuchung der Plaquemorphologie zeigten alle Phagen ein in sich einheitliches Lysisbild in Form entweder trüber oder klarer Lysis, maximal wurden Plaquedurchmesser von 5,5 mm erreicht. Auf einer einzigen Agarplatte der 1.EPA des Phagen fv 83-554/3/3 (G) erschien es jedoch möglich, daß zwei unterschiedliche Lysisbilder vorliegen. Dabei waren einige der Plaques trüber als andere bei diesem bislang durch klare Lysis gekennzeichneten Phagen. Sicherheitshalber erfolgte von diesen Plaques eine parallele Klonierung, auch die elektronenoptischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurden für diesen Phagen separat mit durchgeführt. In der Folge erwies sich dieser mit fv 83-554/3/4 (I) benannte Phage als identisch mit dem Phagen fv 83-554/3/3 (G).

Die Größe der Plaques ließ sich in gewissen Grenzen durch die Inkubationszeit der ausgegossenen Agarplatten beeinflussen, weshalb die Zeit bei Vergleichen konstant gehalten wurde. Dabei ist noch einmal zu verdeutlichen, daß jede Plaque letztlich von einem einzigen Phagen und dessen Nachkommen erzeugt wird (eine Phagenepidemie). Form und Größe der

Plaques sind charakteristisch für jede Bakteriophagenart und genetisch determiniert. Die Ausbildung der Plaques ist dabei von vielen äußeren Faktoren beeinflussbar, wie z.B. die Nährbodenzusammensetzung der verwendeten Agarschalen (abnehmende Plaquegröße bei zunehmender Agarkonzentration), physikalische und chemische Störungen, jedoch auch durch einen Wechsel des Wirtsbakteriums oder eine Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien. Junge, schnell wachsende Bakterien liefern dabei größere Plaques als ältere Bakterien. Für alle durchgeführten Versuche wurden deswegen jeweils frische Kulturen (onc) verwendet. Eine weitere Theorie besagt, daß Phagen kleinerer Abmessungen möglicherweise schneller im Bakterienrasen diffundieren als größere Phagen und somit größere Plaques bilden können. Dafür würden, wenn man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit betrachtet, die großen Plaques der Phagen fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G) bzw. fv 83-554/3/4 (I) sprechen, die den *Podoviridae* angehören, somit nur einen kurzen Schwanz haben und auch eine geringe Größe des Kopfes aufweisen (siehe Tab. 7).

Bei bislang beschriebenen Bakteriophagen finden sich ähnliche Größenangaben wie in der vorliegenden Arbeit. So bildete der von TAMADA (71) isolierte und für *F. necrophorum* spezifische Phage Fn P1 Plaques von 0,5-1,5 mm Durchmesser. Der Phage fv 83-554/3 (M), der von BÖHME (16) isoliert worden war, zeigte ähnlich bemerkenswert große Plaques wie fv 83-554/3/3 (G). Beide Phagen haben mit *F. varium* MLU 83-5534/3 denselben Vermehrungsstamm und gehören zum gleichen Morphotyp, den *Podoviridae*. Ähnlich große bzw. sogar größere Plaques bildete fv Na5 (E), der ebenfalls zu den *Podoviridae* zählt. Der Durchmesser der übrigen Phagen entsprach mit geringen Abweichungen den bereits in anderen Publikationen beschriebenen Angaben (16, 17, 19, 47, 52, 63).

Auch innerhalb desselben Morphotyps schwankten die Plaquesdurchmesser. Bei den *Podoviridae* lagen jedoch vorwiegend große Plaques bis maximal 5,0 mm vor, eine Ausnahme stellt hier der Phage fv 83-554/3/2 (C) dar, der nur Plaques zwischen 1,0 und 3,0 mm bildete. Die Durchmesser der zu den *Siphoviridae* zählenden Bakteriophagen schwankten zwischen 0,5 und maximal 2,5 mm. Sehr kleine Plaques mit einem Durchmesser von maximal 1 mm bildete der Phage fv 81-531/2/2 (B). Diese verhältnismäßig geringe Größe der Plaques bei den *Siphoviridae* könnte durch den langen Schwanz und das dadurch geminderte Diffusionsvermögen der Phagen im Bakterienrasen bedingt sein. Eine Mittelstellung bezüglich der Größe der Plaquesdurchmesser bildeten die beiden *Myoviridae* fv 8501/2 (A) und fv 81-531/2/3 (F), deren Plaques Abmessungen zwischen 0,5 und maximal 4,5 mm zeigten.

Eine höheren Beitrag zur Abgrenzung der Phagen innerhalb desselben Morphotyps brachte die Auswertung der Plaquebegrenzung und der Lysisart. Dabei waren insbesondere die beiden *Myoviridae* in den beiden genannten Merkmalen eindeutig unterschiedlich, was die

Eigenständigkeit der Phagen beweist. Auch die zu den *Siphoviridae* gehörenden Phagen unterschieden sich in jeweils einem dieser Merkmale voneinander (siehe Tabelle 8), was auch hier eine klare Abgrenzung der 3 Phagen untereinander erlaubt. Innerhalb der *Podoviridae* war diese Abgrenzung nicht möglich, da alle Isolate eine scharfe Begrenzung der Plaques bei klarer Lysis aufwiesen.

5.4 Lysisspektrum

Bei der Untersuchung des Lysis- bzw. Wirtsspektrums war festzustellen, daß alle im Rahmen dieser Arbeit isolierten Phagen, deren Vermehrungsstämme sämtlich *F.varium* waren, auch ausschließlich Vertreter dieser Spezies lysierten. Stämme anderer *Fusobacterium*-Spezies zeigten keinerlei lytische Reaktionen. Diese strenge Speziespezifität ist bereits in anderen Arbeiten über Phagen mit Spezifität für verschiedene Arten der Gattungen *Bacteroides* und *Fusobacterium* unter Verwendung einer breiten Palette fakultativ und obligat anaerober Indikatorstämme beschrieben worden. Die Stammspezifität war dagegen bei allen Phagen gering ausgeprägt.

Der Stamm VPI 2392, zeitweise als *F.necrophorum* geführt, konnte aufgrund der Speziespezifität und der durch 8 der 9 Phagen erfolgten eindeutigen Lysis (getestete einfache RTD) sicher als *F.varium* klassifiziert werden.

Im Lysisspektrum der neun Phagen gab es mit Ausnahme von fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) sowie fv 81-531/2/2 (B) und fv 83-680/3 (H) keine völlig übereinstimmenden, allerdings teilweise ähnliche Muster. Die Tests wurden sowohl mit der einfachen als auch mit der 1000fachen RTD mehrmals durchgeführt. Dabei führte die Verwendung der 1000fachen RTD oft zu einer zusätzlichen Lysis von Stämmen. Diese Erweiterung des Lysisspektrums wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (35). Die Beurteilung der Lysismuster auf den als SPOT-Test ausgelegten Agarplatten war in einigen Fällen schwierig, weil einzelne Phagenspots nur trübe oder sehr schwach ausgeprägt waren. Deswegen wurden alle Lysisspektren zur Sicherheit mehrfach bestimmt. Dabei wurden die im Rahmen der Dissertationsarbeit von BÖHME (16) isolierten 5 für *F.varium* spezifischen Phagen zur Erweiterung der Aussagekraft mit in die Untersuchungen einbezogen.

Ein eindeutig übereinstimmendes Lysismuster lieferten die Phagen fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I), was erneut für die Identität beider Phagen spricht.

Betrachtet man die Zuordnung der Bakteriophagen zu den 3 Morphotypen und die erzeugten Lysismuster, so ist festzustellen, daß die Lysismuster der *Siphoviridae* fv 81-531/2/2 (B) und fv 83-680/3 (H) übereinstimmen. Die beiden Phagen sind jedoch nicht miteinander identisch, dies bewiesen die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen, die auffallende

Unterschiede zeigten (siehe Kapitel 4.6 und 4.7). Bei 1000facher RTD waren sich auch die Lysismuster der beiden *Podoviridae* fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G) sehr ähnlich. Bei den Bakteriophagen fv 8501/2 (A) und fv 81-531/2/3 (F), die morphologisch den *Myoviridae* zuzuordnen sind, sprechen die eindeutigen Unterschiede im erzeugten Lysismuster für das Vorliegen eigener Entitäten.

Bei Verwendung der einfachen RTD stimmten die Lysismuster der Phagen fv 81-531/2/3 (F) und fv 83-554/3/3 (G) bzw. fv 83-554/3/4 (I) überein, wobei ersterer zu den *Myoviridae* und die beiden letztgenannten Phagen zu den *Podoviridae* zählen (siehe Tabelle 9). Unter Verwendung der 1000fachen RTD zeigten sich bezogen auf den Morphotyp jedoch eindeutige Unterschiede, so daß trotz aller möglichen verwandschaftlicher Nähe eine klare Abgrenzung möglich ist.

Innerhalb desselben Morphotyps lassen sich somit bis auf fv 81-531/2/2 (B) und fv 83-680/3 (H) bzw. fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) alle Phagen klar voneinander abgrenzen, da jeweils für mindestens einen getesteten Stamm eine unterscheidliche Lysis vorliegt.

Bei der Verwendung der einfachen RTD aller Phagen reduzierte sich die Zahl lysierter *F. varium*-Stämme erheblich, wobei z.T. nur noch einzelne Plaques im aufgetropften SPOT-Test auftraten.

Es zeigte sich, daß nur ein einziger Stamm von *Fusobacterium varium* von allen 13 Phagen unter Einbeziehung der Phagen von BÖHME (16) und unter Verwendung der 1000fachen RTD lysiert wurde. Dies betraf den Stamm MLU 91-2641/1. Alle anderen Bakterienstämme der Spezies *Fusobacterium varium* wurden zwar von mindestens einem aber eben nicht allen Phagen lysiert. Der Stamm *F. varium* MLU 91-2641/1 kann somit als idealer bzw. Universalindikatorstamm für *Fusobacterium varium*-Phagen bezeichnet werden.

Denkbar wäre auch der Einsatz der bisher isolierten Phagen zur Typisierung von *F. varium* - Stämmen durch Lysotypie.

Es gab keinen einzigen Phagen, der ausnahmslos alle getesteten Stämme von *F. varium* lysierte. Bei Verwendung der 1000fachen RTD lysierte der Phage fv 83-554/3/3 (G) jedoch mit Ausnahme von MLU 91-2135/2 alle anderen Stämme. Diese Lücke wird z.B. durch fv Na5 (E) geschlossen, der bis auf MLU 83-188/2 und RMA 5169 ebenfalls alle Stämme lysierte. Somit könnten diese beiden Phagen im Set (als Satz „diagnostischer Phagen“) zur Identifizierung von Stämmen der Spezies *Fusobacterium varium* herangezogen werden.

5.5 Phagen als Indikatoren viraler Abwasserbelastung

Bakteriophagen wurden bereits in mehreren Arbeiten (24, 60, 74) als Indikatoren viraler (Ab)wasserkontamination und Marker bei (Ab)wasserbehandlungsprozessen beschrieben.

Insgesamt waren Bakteriophagen mit Spezifität für Vertreter des Genus *Bacteroides* wesentlich häufiger Gegenstand von Forschungsarbeiten als solche mit Spezifität für Stämme des Genus *Fusobacterium*.

Bakteriophagen ähneln den Enteroviren hinsichtlich Komposition, Größe und Morphologie. Phagen für *Bacteroides* haben daneben den gleichen Ursprung wie die Enteroviren. Intestinale *Bacteroides* als Hauptkomponente menschlicher Faeces und ohne signifikante Vermehrung in der freien Natur (ausserhalb der Wirtsorganismen Mensch und Tier) haben somit ein Potential als Virusindikator. *Bacteroides fragilis*-Phagen sind bereits mehrfach als Indikatoren humaner fäkaler Verunreinigung beschrieben. Dabei war der Direktnachweis der Phagen schwierig und erforderte meist vorangehende Anreicherungs- und Konzentrationstechniken. *Bacteroides fragilis* HSP-40-Phagen wurden nie in Tierkot, sondern nur aus menschlichen Fäkalien isoliert. Dabei gelang aus Proben, bei denen Enteroviren isoliert werden konnten, stets auch der Phagennachweis (74).

Coliphagen wurden im Rahmen einer Arbeit von GANTZER et al. (31), wie bereits von TARTERA (73) beschrieben, etwa einhundertmal häufiger als *Bacteroides fragilis*-Phagen, und diese etwa zehnmals häufiger als Enteroviren selbst isoliert. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Konzentration von *Bacteroides fragilis*-Phagen und dem Vorhandensein infektiöser Enteroviren. Veränderungen der Konzentration der Coliphagen waren im Gegensatz zu *B. fragilis*-Phagen aber nicht mit einer Änderung der Enteroviruskonzentration verbunden, so daß trotz der hohen Korrelation zwischen somatischen Coliphagen und der Anwesenheit von Enteroviren dieser Faktor ein schlechter Indikator für Fluktuationen in der Enteroviruskonzentration ist. Nach Meinung des Autors zeigen Coliphagen somit lediglich die fäkale Kontamination im wortwörtlichen Sinne an, *Bacteroides*-Phagen dagegen waren gute Indikatoren einer Enteroviruskontamination.

ABAD (1) et al. zeigte, daß Phagen mit Spezifität für *Bacteroides fragilis* HSP-40 ähnlich lange auf verschiedenen Oberflächen in der Umwelt, besonders jedoch auf getrockneten Faeces überleben wie das zu den Enteroviren zählende Hepatitis A-Virus oder das humane Rotavirus, jedoch länger als enterische Adenoviren und Polioviren. Widersprüchlich sind Angaben allerdings darüber, inwieweit Phagen direkt aus Fäkalien isoliert werden konnten. CORNAX (25) konnte aus untersuchten Faeces keine Phagen mit Spezifität für *Bacteroides* isolieren, was jedoch TARTERA (72) aus 10% der getesteten Proben menschlicher Faeces gelang.

LUCENA (58) untersuchte in seiner Arbeit 1994 den Einfluß der örtlichen Distanz des verunreinigenden Fokus' auf die Konzentration von *Bacteroides fragilis*-Phagen in Muscheln. Dabei wurden Phagen für *B. fragilis* HSP-40 häufiger gefunden als Enteroviren selbst.

Aus diesen Ausführungen wird deutlich, daß Phagen mit Spezifität für *B.fragilis* HSP-40 zu Recht als mögliche Ersatzindikatoren einer Enterovirus- und damit auch einer humanen fäkalen Abwasserbelastung angesehen werden können.

Das Wissen über Phagen mit Spezifität für Fusobakterien, die ebenso wie *Bacteroides* der Familie *Bacteroidaceae* angehören, ist nach wie vor sehr begrenzt. Als wesentlich ist festzuhalten, daß in der vorliegenden Arbeit aus dem zweiten Abwasser kein Phagennachweis für *B.fragilis* HSP-40 gelang. Diese Probe war analog Abwasser Nr.1 nach ausschliesslich mechanischer Reinigung an identischer Stelle lediglich zeitlich versetzt dem Zulauf entnommen worden. Jedoch konnten wiederum mehrere Phagen über *Fusobacterium varium*-Stämme vermehrt werden. Damit stellt sich die Frage, ob nicht auch Phagen mit Spezifität für *F.varium* genauso oder möglicherweise gar besser als Indikatoren einer fäkalen viralen Abwasserbelastung angesehen werden könnten. Um diese Frage hinreichend beantworten zu können, wäre die Untersuchung einer wesentlich größeren Anzahl von Abwasserproben nötig.

Bakteriophagen, die über den in dieser Arbeit gefundenen universellen Vermehrungs- bzw. Indikatorstamm MLU 91-2641/1 für *Fusobacterium varium*-Phagen vermehrt werden, könnten somit als Indikatoren natürlich verunreinigter Gewässer herangezogen werden. Bei paralleler Verwendung von mehreren Vermehrungsstämmen mit einem sich weitgehend ergänzenden Lysisspektrum könnten Phagen mit noch größerer Wahrscheinlichkeit erfaßt werden.

5.6 Restriktionsanalyse des Phagengenoms

Für die nähere Charakterisierung der Phagen wurde außerdem eine Analyse des Phagengenoms durchgeführt. Alle Phagen besaßen ein DNS-Genom. Dies steht in Übereinstimmung mit dem von BRADLEY et al. (18) formulierten Zusammenhang zwischen Phagenstruktur und Nukleinsäuretyp.

Besonders mit Hilfe der beiden Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *Hind III* konnten weitere Aussagen zur Charakterisierung der Phagen getroffen werden. Bei den Enzymen *Hinf I*, *Sau3A I* und *Ava1* traten auch bei mehrfachen Wiederholungen einschließlich der DNS-Isolierung Bandenmuster auf, die eine sinnvolle Auswertung nicht ermöglichten. Denkbare Ursachen könnten u.a. in der geringen Auflösung des Agarosegels zu sehen sein. Gegebenenfalls wäre eine Trennung sehr dicht benachbarter Banden mit 2 oder 4% Agarosegelen möglich. Für *Sau3A I* ergaben sich ähnlich wie bei *Hinf I* am Anfang der Laufstrecke liegen gebliebene höhermolekulare Einzelbanden und teilweise ein nicht zu differenzierender Schmier (*smear*) von DNS-Fragmenten im niedermolekularen Bereich. Da die Restriktionsversuche mit *Sau3A I* parallel zu solchen mit anderen Enzymen, d.h. an ein und derselben DNS-Probe erfolgten, und die anderen

Restriktionsendonukleasen verwertbare Bandenmuster lieferten, scheint *Sau3A I* die DNS der 9 isolierten Phagen nicht hinreichend zu verdauen.

Nach Verdauung mit *Hind III* war die höchste Anzahl erhaltener Einzelbanden bei den vier Vertretern der *Podoviridae*, also bei fv 83-554/3/2 (C), fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G) bzw. fv 83-554/3/4 (I) zu verzeichnen. Hier lag die Größenordnung der Spaltprodukte - abgesehen von einer bei 32050 bp gelegenen Einzelbande bei fv Na5 (E) - zwischen 820 und 13020bp. Dabei gab es innerhalb dieses Morphotypes zwar gemeinsame Einzelbanden, wie zwischen fv 83-554/3/2 (C) und fv Na5 (E) bei 2495 und 7285 bp, sowie zwischen fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G) bei 1275 und 2035 bp, jedoch zeigten alle Phagen ein insgesamt differentes Bandenmuster. Das beweist wiederum die Eigenständigkeit dieser Phagen. Nach Verdauung mit *EcoRI* war die Bande bei 2530 bp den Phagen fv 83-554/3/2 (C) und fv 83-554/3/3 (G) bzw. fv 83-554/3/4 (I) gemeinsam, wobei die letztgenannten zwei Phagen noch eine übereinstimmende Bande mit fv Na5 (E) bei 6270 bp zeigten. Mit *EcoRI* lag jedoch ein im Gesamtbild eindeutig unterschiedliches Ergebnis vor, was die Unterschiedlichkeit der Phagen erneut bestätigt. Eine Ausnahme bildeten fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I), deren Identität mit einem übereinstimmenden Bandenmuster nach Restriktion sowohl mit *EcoRI* als auch mit *Hind III* bestätigt wurde.

Die definitive Verifizierung der Identität von Einzelbanden ist jedoch nur durch andere Methoden wie z.B. eine Sequenzierung möglich.

Bei den zu den *Myoviridae* gehörenden Phagen fv 8501/2 (A) und fv 81-531/2/3 (F) lagen alle erhaltenen DNS-Bruchstücke nach Restriktion mit *Hind III* zwischen 1010 und 4885 bp, nach Restriktion mit *EcoRI* zwischen 2500 und 21320 bp. Dabei zeigten für *Hind III* beide Phagen die gleiche Gesamtzahl von 10 Banden. Identische Banden gab es aber bis auf die bei 4885 bp (nach Verdauung mit *Hind III*) nicht, was beweist, daß auch diese Phagen jeweils eine eigene Entität darstellen.

Bei den *Siphoviridae* bestanden nach Verdauung ihrer Nukleinsäure sowohl mit *Hind III* als auch *EcoRI* deutlich differente Bandenmuster. Der Phage fv 8501/3 (D) wird durch *Hind III* offenbar nicht verdaut, hier lag eine einzige Bande bei ca. 49335 bp vor. Gleiches gilt für den Phagen fv 81-531/2/2 (B), bei dem nach Restriktion mit *EcoRI* auch nur eine Bande bei 25000 bp zur Darstellung kam. Dies kann aber insofern nicht der unverdauten DNS entsprechen, da die Summe der Basenpaare der erkennbaren Einzelbanden bei Verwendung von *Hind III* bereits 79430bp beträgt.

Betrachtet man zusammenfassend die erzielten Ergebnisse für die Phagen jeweils innerhalb desselben Morphotyps, wird wie bereits bei den anderen Charakterisierungsmerkmalen bestätigt,

daß mit Ausnahme von fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) alle anderen Phagen eigenständig sind, d.h. jeweils als eigene Entität betrachtet werden müssen.

Bei der Ermittlung der Gesamtgenomgröße aus der Summe der Einzelfragmente im Vergleich der einzelnen Enzyme traten gewisse Schwankungen auf. Gründe hierfür sind mögliche Meßfehler, das Auftreten eng beieinander liegender Doppelbanden und kleinster Bruchstücke, das Vorkommen voll verdauter DNS sowie die mathematische Fehlerbreite bei der computergestützten Errechnung der Bandengröße anhand des mitgeführten Markers.

Für die Phagen Genome lässt sich bei den Vertretern der *Myoviridae* eine orientierende Größenangabe um 43000 bp machen. Für die morphologisch den *Siphoviridae* zugehörigen Bakteriophagen sind dagegen Größen zwischen 58000 und 79000 bp und für die Podoviren zwischen 49000 und 76000 bp anzunehmen. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen am ehesten dafür geeigneten Angaben von BÖHME (16), so liegen dort zumindest in Bezug auf die Obergrenze ähnliche Größenordnungen vor.

5.7 Analyse der Phagenproteine

Bei der Darstellung der isolierten Strukturproteine der Bakteriophagen ergaben sich technische Schwierigkeiten insofern, als für die Herstellung größerer Mengen Protein eine große Anzahl hochtitriger Lysate zur Extraktion der Phagenproteine hergestellt werden musste. Bei der Extraktion erwiesen sich die Ultrazentrifugation (Glycerolgradientenzentrifugation) und die anschließende Präparation des Pellets als aufwendig. Auch bei der Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE zeigte sich trotz identischer Durchführung nicht für jeden Phagen immer ein befriedigendes Ergebnis hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Bandenzahl. Mögliche Ursachen für diese Schwierigkeiten sind nicht nur in der Extraktionsprozedur zu sehen, sondern auch darin, daß nicht für jeden Phagen ausreichend hohe Titer erhalten werden konnten, und daher für jeden Phagen unterschiedliche Mengen an Protein extrahiert wurden.

Zusätzlich zeigten sich bei den Elektrophoresen z.T. schwache Nebenbanden, die nicht eindeutig auszuwerten waren.

Bei der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE stellte sich für jeden Phagen ein eigenes Muster an Haupt- und Nebenbanden dar. Außer den zu den *Podoviridae* zählenden Phagen fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I), die in allen Charakterisierungsmerkmalen übereinstimmten und somit als identisch zu bezeichnen sind, zeigten die anderen Phagen ein jeweils unterschiedliches Bandenmuster. Jedoch bestehen oft vergleichbare Verhältnisse unter

den einzelnen Phagen, worauf aus teilweise übereinstimmenden bzw. eng benachbarten Einzelbanden geschlossen werden kann. Dies betraf insbesondere die beiden zu den *Podoviridae* zählenden Phagen fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G), die sich bereits bei der Untersuchung der Lysismuster als sehr ähnlich gezeigt hatten. Diese beiden Phagen zeigten gemeinsame Banden bei 128 und 78 kDa. Eng beieinander lagen auch die Banden mit 32,5 und 34 kDa, 43 und 45 kDa sowie 64 und 66 kDa. Jedoch gab es auch eindeutig unterschiedliche Banden, die zeigen, daß jeder der Phagen bei aller möglichen verwandtschaftlichen Nähe eine Entität darstellt.

Obwohl das identische Lysismuster der beiden *Siphoviridae* fv 81-531/2/2 (B) und fv 83-680/3 (H) eine mögliche enge Verwandtschaft bedeuten konnte, wurde mit der Charakterisierung der Strukturproteine die Unterschiedlichkeit und Eigenständigkeit beider Phagen belegt.

Bei den zu den *Myoviridae* zählenden fv 8501/2 (A) und fv 81-531/2/3 (F) konnten ebenfalls Banden ähnlichen Molekulargewichts gefunden werden. Dies war für die Molekulargewichte von 38 und 39 kDa sowie 45 und 47 kDa der Fall. Eine einzelne Bande jeweils bei 43 kDa ist höchstwahrscheinlich sogar identisch. Dies läßt gleichgeartete strukturelle Komponenten der Bakteriophagen vermuten. Andererseits wird durch das gleichzeitige Vorliegen eindeutiger Unterschiede auch hier die Eigenständigkeit beider Phagen belegt.

Innerhalb desselben Morphotyps zeigten sich bei allen Phagen individuell Banden, die insgesamt bewiesen, daß außer fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) keiner der Bakteriophagen mit einem anderen identisch ist. Sämtliche Proteine der Phagen lagen in einer Größenordnung zwischen 30 und 138 kDa. Die Anzahl der Einzelbanden pro Phage schwankte zwischen 2 und 11. Dies entspricht weitgehend den bereits bei BÖHME (16) für *F. varium*-Phagen erhobenen Befunden.

Nicht geklärt werden konnte, ob es sich bei den dargestellten Strukturproteinen um Elemente des Phagenkopfes oder –schwanzes handelt. Diesbezügliche Aussagen wären nur nach vorheriger Trennung dieser Strukturanteile möglich.

In Abweichung der Ergebnisse von BÖHME (16), wo die Vertreter der *Podoviridae* nur sehr wenige Einzelbanden zeigten, konnten in dieser Arbeit vor allem bei fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G) 7 bzw. 9 Banden abgebildet werden. Durch die Kürze des Schwanzes kann man vermuten, daß die Großzahl dieser Banden Strukturproteinen des Kopfes zuzuordnen sind, da durch dessen Aufbau die Proteine wahrscheinlich in höheren Kopienzahlen vorliegen.

5.8 Weitere Aspekte

Das Merkmal der Indolbildung aus Tryptophan, das für die Identifikation von Spezies innerhalb anaerober Keime wertvoll ist, ist bei Stämmen von *Fusobacterium varium* unterschiedlich

ausgeprägt, d.h. es gibt sowohl indolpositive als auch –negative Stämme. Soweit bisher bekannt ist, tritt diese variable Reaktion bei keiner anderen Spezies von *Fusobacterium* auf. So produzieren beispielsweise Stämme von *F.nucleatum*, *necrophorum* und *gonidiaformans* Indol, während Vertreter von *F.mortiferum* indolnegativ sind.

Im Rahmen der durchgeführten Versuche lysierten alle Phagen einschließlich der von BÖHME (16) beschriebenen Isolate sowohl indolpositive als auch –negative Stämme, so daß die Eigenschaft der Indolbildung bzw. deren Fehlen nur im positiven Fall eine Abgrenzung zu den indolnegativen Spezies des Genus *Fusobacterium* erlaubt.

Andererseits eröffnet sich hierdurch die Möglichkeit der Etablierung eines Transduktionssystemes innerhalb der Spezies *F.varium* mit der Indolbildung als Marker zur sicheren Kennzeichnung (Erkennung) von Donatoren und Transduktanten indolpositiver bzw. indolnegativer Stämme. Dies konnte im Rahmen der Fragestellungen der Arbeit jedoch nicht weiter bearbeitet werden.

6 Zusammenfassung

Bakteriophagen mit Spezifität für obligat anaerobe gramnegative sporenlose Stäbchen der Familie *Bacteroidaceae* sind bis heute im wesentlichen nur für das Genus *Bacteroides* näher erforscht. Über spezifische Phagen für das Genus *Fusobacterium* liegen bisher wenig Erkenntnisse vor (HUET und THOUVENOT (47), BRADLEY (17), TAMADA (71), BÖHME (16), HÖHNE (44) und ANDREWS (10)).

Dabei handelt es sich einerseits um einen Phagen mit Spezifität für *F.necrophorum*, der morphologisch den *Myoviridae* angehört, und andererseits um je 3 Phagen mit Zugehörigkeit zu den *Podoviridae* bzw. *Siphoviridae* und Spezifität für *F.varium*.

Eine Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es daher, weitere Phagen mit Spezifität für Stämme des Genus *Fusobacterium* und möglichst der Zugehörigkeit zu weiteren Morphotypen zu isolieren und näher zu charakterisieren.

Dazu wurden zwei unterschiedliche Abwasserproben untersucht, aus denen die Isolierung von neun Bakteriophagen mit ausschliesslicher Spezifität für *Fusobacterium varium* gelang. Die Benennung der Bakteriophagen erfolgte in Anlehnung an ACKERMANN analog zur Bezeichnung ihrer Wirtsstämme mit fv 8501/2, fv 81-531/2/2, fv 83-554/3/2, fv 8501/3, fv Na5, fv 81-531/2/3, fv 83-554/3/3, fv 83-680/3 und fv 83-554/3/4. Dabei wurde dem Umstand Rechnung getragen, daß bereits BÖHME (16) fünf Phagen auf teilweise identischen

Vermehrungsstämmen gefunden hatte. Den im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten Phagen wurde so in ihrer Bezeichnung eine weitere laufende Nummer gegeben. Weiterhin wurden den 9 Phagen zur Vereinfachung Abkürzungen in Form von Großbuchstaben (A - I) zugeordnet.

Die Isolierung von Phagen für Stämme der Spezies *Fusobacterium mortiferum*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium gonidiaformans* und 2 nicht auf Speziesebene identifizierbare Fusobakterien (*F.species*) gelang nicht. Nur aus dem ersten Abwasser konnte ein für *Bacteroides fragilis* HSP-40 spezifischer Phage isoliert werden.

Die elektronenoptischen Untersuchungen ergaben, daß erstmals die Isolierung von zwei Bakteriophagen mit Spezifität für *Fusobacterium varium* gelungen war, die mit ihrem dicken langen, nicht flexiblen aber wahrscheinlich kontraktilen Schwanz dem morphologischen Typ A nach BRADLEY (18) bzw. den *Myoviridae* zuzuordnen sind.

Die anderen Phagen gehörten zu den Morphotypen der *Sipho-* bzw. der *Podoviridae*, für die bereits in der vorhandenen Literatur Vertreter mit Fusobakterienspezifität beschrieben sind. Mit den Phagen fv 81-531/2/2 (B), fv 8501/3 (D) und fv 83-680/3 (H) konnten drei weitere Phagen für *F.varium* und morphologischer Zuordnung zu den *Siphoviridae* gefunden werden. Erstmals war dies BÖHME 1996 ebenfalls für drei Phagen gelungen.

Zur Charakterisierung wurden neben den elektronenoptischen Untersuchungen zur Ermittlung der Ultrastruktur die Bestimmungen der Plaquemorphologie, das Verhalten gegenüber Chloroform, das Lysisspektrum sowie die Analysen der Strukturproteine bzw. der Phagengenome herangezogen.

Alle Phagen erwiesen sich als chloroformresistent. Dagegen gab es z.T. deutliche Unterschiede in Bezug auf das plaquemorphologische Erscheinungsbild und die auf den verwendeten Bakterienstämmen erzeugten Lysismuster.

Die Plaquedurchmesser, die insgesamt zwischen 0,5 und 5 mm lagen, schwankten auch innerhalb desselben Morphotypes. Allerdings bildeten die Vertreter der *Podoviridae* vorwiegend große Plaques bis maximal 5,0 mm. Dies könnte mit der durch den sehr kurzen Schwanz und die damit geringe Gesamtgröße begünstigte Diffusion der Phagen im Bakterienrasen begründet werden. Die Beobachtung der Plaquebegrenzung und die Unterscheidung trüber bzw. klarer Lysis ermöglichte bei den *Sipho-* und *Myoviridae* durch das Vorliegen eindeutiger Unterschiede innerhalb desselben Morphotypes die Abgrenzung der einzelnen Phagen als Beleg ihrer Eigenständigkeit.

Die zu den *Podoviridae* zählenden Phagen fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) sowie die *Siphoviridae* fv 81-531/2/2 (B) und fv 83-680/3 (H) stimmten hinsichtlich ihrer auf den Bakterienstämmen erzeugten Lysismuster überein. Alle weiteren Phagen zeigten ein unterschiedliches Lysisspektrum. Alle untersuchten Stämme der Spezies *Fusobacterium varium*

wurden von mindestens einem der Phagen lysiert. Der Stamm *Fusobacterium varium* MLU 91-2641/1 wurde neben allen im Rahmen dieser Arbeit isolierten auch von denen bei BÖHME (16) gefundenen Bakteriophagen lysiert, deshalb kann man diesen Stamm als idealen Vermehrungs- bzw. Universalindikatorstamm für *F.varium*-Phagen bezeichnen.

Die Phagen fv Na5 (E) und fv 83-554/3/3 (G) könnten zusammen als „Satz diagnostischer Phagen“ zur Identifizierung von Stämmen der Spezies *Fusobacterium varium* herangezogen werden, da beide zusammen alle getesteten Stämme von *F.varium* lysierten.

Weitere Untersuchungen müssen ergeben, inwiefern Phagen mit Spezifität für *Fusobacterium varium* genauso gut oder sogar besser als Indikatoren viraler Kontamination natürlich verunreinigter Abwässer bzw. einer fäkal-oralen Abwasserbelastung verwendet werden können, wie es für *Bacteroides fragilis*-Phagen beschrieben wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin.

Alle untersuchten Phagen besitzen DNS-Genome. Für die Gesamtgröße der DNS-Moleküle können Angaben zwischen 43000 und 79000 bp angenommen werden. Nicht jede Phagen-DNS konnte durch die verwendeten Restriktionsenzyme ausreichend verdaut werden. Wie auch bei der Untersuchung der Strukturproteine ergaben sich unter Berücksichtigung der Zuordnung zum jeweiligen Morphotyp zwischen einzelnen Bakteriophagen Ähnlichkeiten im Bandenmuster ohne absolute Übereinstimmungen. Die sichtbar gemachten Hauptstrukturproteine (Hauptbanden) aller Phagen lagen in einer Größenordnung zwischen 39 und 61 kDa, in der Mehrzahl jedoch zwischen 40 und 50 kDa.

Mit Ausnahme von fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) war keiner der Bakteriophagen mit einem anderen in allen untersuchten Merkmalen absolut identisch, so daß zusammenfassend jeder Phage als eigene Entität angesehen werden muß. Gewisse Übereinstimmungen in einzelnen Charakteristika lassen auf bestehende verwandschaftliche Beziehungen zwischen den Phagen schließen.

Die Eigenschaft der Indolbildung aus Tryptophan bzw. deren Fehlen erlaubt keine Abgrenzung zu anderen Spezies des Genus *Fusobacterium*, weil sowohl indolpositive als auch –negative Stämme von den 9 Phagen dieser Arbeit wie auch von denen bei BÖHME gefundenen Isolaten lysiert wurden. Dies eröffnet andererseits die Möglichkeit der Etablierung eines Transduktionssystems innerhalb der Spezies *F.varium* mit dem Merkmal der Indolbildung als kontraselektivem Marker zwischen indolpositiven und –negativen Stämmen.

7 Literaturverzeichnis

- (1) ABAD, F.X., PINTÓ, R.M., BOSCH, A.:
Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl Environ Microbiol* 60 (1994) 3704-3710
- (2) ACKERMANN, H.-W.:
Frequency of morphological phage description in the year 2000. Brief review. *Arch Virol* 146 (2001) 843-857
- (3) ACKERMANN, H.-W., ELZANOWSKI, A., FOBO, G., STEWART, G.:
Relationships of tailed phages: a survey of protein sequence identity. *Arch Virol* 140 (1995) 1871-1884
- (4) ACKERMANN, H.-W.:
Bacteriophages. In: LEDERBERG, J. (Ed): *Encyclopedia of Microbiology*, Volume 1. Academic Press, Inc., London; 1992, S. 203-215
- (5) ACKERMANN, H.-W.:
Phagentaxonomie 1990: Stand und Probleme. *Bioforum* 14 (1991) 419-426
- (6) ACKERMANN, H.-W., BERTHIAUME, L.:
Atlas of Virus Diagrams. CRC-Press, Inc., Boca Raton. 1995, S. 112-129
- (7) ADAMS, M.:
Bacteriophages. Interscience Publishers Inc., New York, 1959
- (8) ALATOSSAVA, T., FORSMAN, P., RITZENTHALER, P.:
Genome homology and superinfection immunity between temperate and virulent *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages. *Arch Virol* 140 (1995) 2261-2268
- (9) AMOAKO, K.K., GOTO, Y., SHINJO, T.:
Comparison of extracellular enzymes of *Fusobacterium necrophorum* subsp. *necrophorum* and *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme*. *J Clin Microbiol* 31 (1993) 2244-2247
- (10) ANDREWS, D.M.A., GHARBIA, S.E., SHAH, H.N.:
Characterization of a novel bacteriophage in *Fusobacterium varium*. *Clin Infect Dis* 25 (1997) 287-288
- (11) ANDREWS, D.M.A., GHARBIA, S.E., SHAH, H.N.:
Genomic structure and organization of a bacteriophage specific within the species *Fusobacterium varium*. *Rev Med Microbiol* 8 Suppl. 1 (1997) 39-40
- (12) ARMON, R., KOTT, Y.:
A simple, rapid and sensitive presence/absence detection test for bacteriophage in drinking water. *J Appl Bact* 74 (1993) 490-496

- (13) AUSUBEL, F.M.:
Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. 2nd edition. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, Chichester, Brisbane usw., 1992
- (14) BENNET, K.W., ELEY, A.:
Fusobacteria: new taxonomy and related diseases. J Med Microbiol 39 (1993) 246-254
- (15) BOOTH S.J., van TASSEL, R.L., JOHNSON, J.L., WILKINS, T.D.:
Bacteriophages of Bacteroides. Rev Infect Dis 1 (1979) 230-314
- (16) BÖHME, F.:
Isolierung und Charakterisierung von Fusobacterium varium-Phagen
Halle, Univ., Med.Fak., Diss. (1996)
- (17) BRADLEY, D.E.:
Ultrastructural studies of Sphaerophorus varius and the infective process of an associated bacteriophage. Can J Microbiol 18 (1972) 1103-1111
- (18) BRADLEY, D.E.:
Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bact. Rev. 31 (1967) 230-314
- (19) BRANDIS, H., VOIGT, W.-H., VIEBAHN, A.:
Morphologische und biologische Eigenschaften des Bacteroides fragilis-Bakteriophagen ϕ A1. Z Bakt, I.Abt. Orig. A 222 (1972) 57-63
- (20) BRANDIS, H., PULVERER, G.:
Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. 6.Auflage., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1988 S.270-274, S.411-417, S.585-592
- (21) BURT, S.J., WOODS, D.R.:
Transfection of the anaerobe Bacteroides thetaiotaomicron with phage DNA. J Gen Microbiol 103 (1977) 181-187
- (22) CLAROS, M.C., CITRON, D.M., GOLDSTEIN, E.J.C., HÖHNE, C., GREISZ, A., OTTO, F., RODLOFF, A.C.:
Characteristics of bile-resistant Fusobacterium species. Poster presentation on the Annual Meeting of American Society for Microbiology, Los Angeles, 2000
- (23) COOPER, S.W., SZYMCAK, E.G., JACOBUS, N.V., TALLY, F.P.:
Differentiation of Bacteroides ovatus and Bacteroides thetaiotaomicron by means of bacteriophage. J Clin Microbiol 20 (1984) 1122-1125
- (24) CORNAX, R., MORINIGO, M.A., PAEZ, I.G., MUNOZ, M.A., BORREGO, J.J.:
Application of direct plaque assay for detection and enumeration of bacteriophages of Bacteroides fragilis from contaminated water samples. Appl Environ Microbiol 56 (1990) 3170-3173
- (25) CORNAX, R., MORINIGO, M.A., GONZALEZ-JAEN, F., ALONSO, M.C., BORREGO, J.J.:
Bacteriophages presence in human faeces of healthy subjects and patients with gastrointestinal disturbances. Z Bakt 281 (1994) 214-224

- (26) DANIELA, N.; ALADWISE, Z.; WIPPERMANN, B.:
Bakteriophagen zur Therapie von multiresistenten Bakterien. Medizinische Hochschule Hannover, Unfallchirurgische Klinik (1997), nicht veröffentlichte Arbeit
- (27) DAVIDSON, A. J.; ELLIOTT, R.M.:
Molecular Virology – A Practical Approach. Oxford University Press, New York, 1993
- (28) DIFCO LABORATORIES:
DIFCO Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures. 9th edition. DIFCO Laboratories incorporated, Detroit 1, Michigan, 1953, S. 76-81
- (29) DUERDEN, B.I., DRASAR, B.S.:
Anaerobes in Human Disease. Edward Arnold, A division of Hodder & Stoughton, London, Melbourne, Auckland, 1991
- (30) FOGLESONG, M.A., MARKOVETZ, A.J.:
Morphology of bacteriophage - like particles from *Fusobacterium symbiosum*. J Bacteriol 119 (1974) 325-329
- (31) GANTZER, C., MAUL, A., AUDIC, J.M., SCHWARTZBROD, L.:
Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. Appl Environ Microbiol 64 (1998) 4307-4312
- (32) GAUTIER, M., ROUAULT, A., SOMMER, P., BRIANDET, R.:
Occurrence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in swiss cheese. Appl Environ Microbiol 61 (1995) 2572-2576
- (33) GEISSLER, E.:
Bakteriophagen – Objekte der modernen Genetik. Akademie-Verlag, Berlin, 1962
- (34) GHARBIA, S.E., SHAH, H.N.:
Heterogeneity within *Fusobacterium nucleatum*, proposal of four subspecies. Letters in Appl Microbiol 10 (1990) 105-108
- (35) GOODFELLOW, M., BOARD, R.G.:
Microbiological classification and identification. Academic Press, London, New York, Toronto (usw.), 1980, S. 321-325
- (36) HAHN, H., FALKE, D., KLEIN, P.:
Medizinische Mikrobiologie. 2. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1994, S. 619
- (37) HAVELAAR, A.H., POT-HOGEBOOM, W.M., FURUSE, K., POT, R., HORMANN, M.P.:
F-specific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin. J Appl Bacteriol 69 (1989) 30-37

- (38) HAYES, W.:
The Genetics of Bacteria and their Viruses. 3rd edition. Blackwell scientific publications, Oxford, 1965
- (39) d' HERELLE, F.:
Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. C. R. Soc. Biol., Paris, 165, (1917), S. 373-375
- (40) HEYM, T.:
Assoziation des primären Fibromyalgie-Syndroms mit dem Vorkommen von Bakteriophagen im Stuhl. Hannover, Medizinische Hochschule, Diss. (1996)
- (41) HÖHNE, C., HÜBNER, G., SANDOW, D.:
Methodologic problems in the detection of indole formation by anaerobic pathogens. Z Bakt Hyg Orig. A 265 (1987) 314-22
- (42) HÖHNE, C., WEIDHASE, R., GIESECKE, F., VERHAGEN, W.:
Preliminary characterization of a new bacteriophage specific for *Bacteroides eggerthii*. Abstract book of the IXth Congress of Virology (Glasgow), 1993, S.365
- (43) HÖHNE, C., WEIDHASE, R., GIESECKE, F., NEUMANN, D., SANDOW, D.:
Isolation and characterization of a bacteriophage specific for *Bacteroides eggerthii*. Abstract book of the Fourth European Congress and Second International Symposium on Anaerobic Bacteria and Infections (Wien), 1992, S.50
- (44) HÖHNE, C., VERHAGEN, W., BÖHME, F.:
Isolation and characterization of five phages with specificity for the species *Fusobacterium varium*. Rev Med Microbiol 8 Suppl. 1 (1997) 38-39
- (45) HÖHNE, C., OTTO, F., VERHAGEN, W., PARTHIER, C.:
Detection and characterization of *Fusobacterium varium*-phages of different morphotypes and first description of phages specific for the species *Fusobacterium varium* belonging to the Myoviridae. Abstract book of ANAEROBE 2000 – An International Congress of the Confederation of Anaerobe Societies (Manchester), 2000, S. 279
- (46) HÖHNE, C.:
Klinisch-mikrobiologische Untersuchungen über Kultivierung, Differenzierung, Vorkommen und Chemotherapeutikaresistenz von *Bacteroides*. Halle, Univ., Med.Fak., Dissertation B (1985)
- (47) HUET, M., THOUVENOT, M.H.:
Etude d'un bacteriophage actif sur une Bacterie anaerobie: *Sphaerophorus varius*. Ann Inst Pasteur 106 (1964) 867-877
- (48) JACKSON, R.H., McCAFFERTY, J., JOHNSON, K.S., POPE, A.R., ROBERTS, A.J., CHISWELL, D.J., CLACKSON, T.P., GRIFFITHS, A.D., HOOGENBOOM, H.R., WINTER, G.:
Selection of variants of antibodies and other protein molecules using display on the surface of bacteriophage fd. In: REES, A.R.; STERNBERG, M.J.E.; WETZEL, R. (Ed): Protein engineering : a practical approach. IRL Press at Oxford University Press, New York, 1992, S. 279-280

- (49) JOFRE, J., OLLE, E., RIBAS, F., VIDAL, A., LUCENA, F.:
Potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 61 (1995) 3227-3231
- (50) JOUSIMIES-SOMER, H:
Recently described clinically important anaerobic bacteria: taxonomic aspects and update. *Clin Infect Dis* 25 Suppl 2 (1997) 78-87
- (51) JOUSIMIES-SOMER, H.R., SUMMANEN, P.H., FINEGOLD, S.M. :
Bacteroides, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* and Other Anaerobic Gram-Negative Bacteria. In: MURRAY, P.R.(Ed): *Manual of clinical microbiology*, 6th edition. American Society of Microbiology, Washington, 1995, S. 603-621
- (52) KELLER, R., TRAUB, N.:
The characterization of *Bacteroides fragilis* bacteriophage recovered from animal sera: observations on the nature of *Bacteroides* phage carrier cultures. *J Gen Virol* 24 (1974) 179-189
- (53) KLAUS, S., KRÜGER, D., MEYER, J.:
Bakterienviren. 1.Aufl. Gustav Fischer-Verlag, Jena, 1992, S.112-130
- (54) KLIEVE, A.V., HUDMAN, J.F., BAUCHOP, T.:
Inducible bacteriophages from ruminal bacteria. *Appl Environ Microbiol* 55 (1989) 1630-1634
- (55) KORY, M.M., BOOTH,S.J.:
Characteristics of *Bacteroides fragilis* bacteriophages and comparison of their DNAs. *Curr Microbiol* 14 (1986) 199-203
- (56) KULTAEV, M.S.,PASHKOV, E.P., KOCHMASOVA Z.N., BYKOV A.S.:
Identification of *Bacteroides* and *Fusobacterium* using antibiotic- and bileimpregnated disks. *Antibiot Med Biotekhnol* 30 (7) (1985) 507-11
- (57) LASKIN, A.I., LECHEVALIER, H.A.:
CRC Handbook of microbiology, CRC Press. Inc., Cleveland, 1978, S. 273, 652-664
- (58) LUCENA, F., LASOBRAS, J., McINTOSH, D., FORCADELL, M., JOFRE, J.:
Effect of distance from the polluting focus on relative concentrations of *Bacteroides fragilis* phages and coliphages in mussels. *Appl Environ Microbiol* 60 (1994) 2272-2277
- (59) LUCENA, F., MUNIESA, M., PUIG, A., ARAUJO, R., JOFRE, J.:
Simple concentration method for bacteriophages of *Bacteroides fragilis* in drinking water. *J Virol Meth* 54 (1995) 121-130
- (60) MIGNOTTE, B., MAUL, A., SCHWARTZBROD, L.:
Comparative study of techniques used to recover viruses from residual urban sludge. *J Virol Meth* 78 (1999) 71-80

- (61) MIMS, C., PLAYFAIR, J.H.L., ROITT, I.M., WAKELIN, D, WILLIAMS, R.:
Medical Microbiology. Mosby, London, 1993, Kap. 3.2-3.3, 39.12
- (62) MORRIS, L.M., ANDREWS, R.H., ROGERS, A.H.:
Investigations of the taxonomy and systematics of *Fusobacterium nucleatum*
using allozyme electrophoresis. *Int J Syst Microbiol* 47 (1997) 103-110
- (63) NACESCU, N., BRANDIS, H., WERNER, H.:
Isolierung von zwei *Bacteroides fragilis*-Phagen aus Abwasser und Nachweis lysogener
B. fragilis Stämme. *Z Bakt, I. Abt. Orig. A* 219 (1972) 522-529
- (64) PITT, T.L., GASTON, M.A.:
Bacteriophage Typing. *Methods Mol Biol* 46 (1995) 15-26
- (65) PREVOT, A.R., MANDIN, J., GIUNTINI, J., THOUVENOT, H.:
Étude d'un phage actif sur les corynebactéries anaerobies. *Ann Inst Pasteur* 91 (1956)
765-767
- (66) ROLLE, M.:
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen und
Agrarwissenschaftler: Lehrbuch für Studium und Praxis. Ferdinand Enke-Verlag,
Stuttgart, 1978, S. 706-707
- (67) SABISTON, C.B., COHL, M.E.:
Bacteriophage virulent for species of the genus *Bacteroides*. *J Dent Res* 48 (1969) 599
- (68) SAMBROOK, J., FRITSCH, T., MANIATIS, T.:
Molecular cloning – A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989,
Kap. 2.73-6.19, 18.40-18.56
- (69) SHERRIS, J.C., CHAMPOUX, J.J.:
Medical microbiology: an introduction to infectious diseases. Elsevier Science
Publishing Co., Inc., New York, 1992, S. 80-83, 338-340
- (70) SPRINGTHORPE, V.S., LOH, C.L., ROBERTSON, W.J., SATTAR, S.A.:
In situ survival of indicator bacteria, MS-2 phage and human pathogenic viruses
in river water. *Wat Sci Tech* 27 (1993) 413-420
- (71) TAMADA, H., HARASAWA, R., SHINJO, T.:
Isolation of a bacteriophage in *Fusobacterium necrophorum*. *Jpn J Vet Sci* 47 (1985)
483-486
- (72) TARTERA, C., JOFRE, J.:
Bacteriophage active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Appl Environ
Microbiol* 53 (1987) 1632-1637
- (73) TARTERA, C., ARAUJO, R., MICHEL, T., JOFRE, J.:
Culture and decontamination methods affecting enumeration of phages infecting
Bacteroides fragilis in sewage. *Appl Environ Microbiol* 58 (1992) 2670-2673

- (74) TARTERA, C., LUCENA, F., JOFRE, J.:
Human origin of *Bacteroides fragilis* bacteriophages present in the environment. *Appl Environ Microbiol* 55 (1989) 2696-2701
- (75) TWORT, F.W.:
An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet* 2 (1915)
S. 1241-1243
- (76) ZUCKERMAN, A.J., BANATVALA, J.E., PATTISON, J.R.:
Principles and practice of clinical virology. Library of congress cataloging-in-publication data, Oxford, 1990, S. 199-200

8 Thesen

1. Gramnegative anaerobe sporenlose Stäbchen der Familie *Bacteroidaceae* sind klinisch relevante Erreger endogener pyogener Infektionen bei Menschen. Dabei haben neben *Bacteroides* auch Vertreter der Gattung *Fusobacterium* große Bedeutung.
2. Bei den Bakteriophagen werden 13 morphologisch differente Familien unterschieden, wobei etwa 96% aller bekannten Isolate zu den geschwänzten Bakterienviren gehören. Unter diesen unterscheidet man *Myoviridae*, *Siphoviridae* und *Podoviridae*.
3. Bakteriophagen mit Spezifität für obligat anaerobe gramnegative Stäbchen der Familie *Bacteroidaceae* sind bis heute im Wesentlichen nur für das Genus *Bacteroides* näher erforscht. Über Phagen mit Spezifität für das Genus *Fusobacterium* liegen bisher nur wenige Erkenntnisse vor, hier sind nur wenige Vertreter bekannt.
4. Der Phage FnP1 mit Spezifität für *F.necrophorum* gehört als einziger bekannter Vertreter seiner Art zu den *Myoviridae*. Bei *F.varium* sind bisher insgesamt 7 Phagen beschrieben worden, wobei für 6 die Morphologie bekannt ist: 3 Podoviren und 3 Siphoviren.
5. Aus zwei unterschiedlichen Abwasserproben konnten insgesamt 9 verschiedene Phagen mit ausschließlicher Spezifität für *Fusobacterium varium* isoliert werden. Phagen für Stämme der Spezies *Fusobacterium necrophorum*, *F.mortiferum*, *F.gonidiaformans* und 2 nicht auf Speziesebene identifizierten Fusobakterien konnten nicht nachgewiesen werden. Nur aus der 1. Abwasserprobe gelang gleichzeitig die Isolation eines Phagen mit Spezifität für *Bacteroides fragilis* HSP-40.
6. Die Bezeichnung der Bakteriophagen erfolgte nach üblicher Vorgehensweise mit den Initialen ihres Wirtsstammes und den nachfolgenden Stammnummern als fv 8501/2, fv 8501/3, fv 81-531/2/2, fv 81-531/2/3, fv 83-554/3/2, fv 83-554/3/3, fv 83-680/3 und fv Na5. Dabei wurde neuen Isolaten, d.h. die bei bereits existierenden Phagen auf dem gleichen Wirtsstämmen isoliert wurden, jeweils eine laufende Nummer nachgestellt.

7. Zwei der Isolate (fv 8501/2, fv 81-531/2/3) gehörten mit ihrem ikosaedrischen Kopf und dem langen dicken, nicht flexiblen aber wahrscheinlich kontraktilen Schwanz zum Morphotyp der *Myoviridae*. Dies ist die erste Beschreibung von Phagen diesen Morphotyps mit Spezifität für *Fusobacterium varium*. Alle anderen Isolate gehörten morphologisch zu den bereits für *F. varium* vorbeschriebenen *Sipho*- bzw. *Podoviridae*.
8. Der Beitrag der Plaquemorphologie zur Phagencharakterisierung ist insgesamt begrenzt. Eine Abgrenzung der einzelnen Phagen innerhalb eines Morphotyps war bei den Vertretern der *Myoviridae* und der *Siphoviridae* jedoch auch mit diesem Merkmal möglich.
9. Alle Phagen erwiesen sich als chloroformresistent.
10. Alle Phagen zeigten eine strenge Speziespezifität bei nur gering ausgeprägter Stammspezifität.
11. Der Stamm *Fusobacterium varium* MLU 91-2641/1 wurde von allen im Rahmen dieser Arbeit isolierten ebenso wie bereits von denen bei BÖHME (16) gefundenen Bakteriophagen lysiert. Deswegen kann dieser Stamm als universeller Indikatorstamm für *F. varium*-Phagen angesehen werden.
12. Ein Nutzen der isolierten Phagen könnte in der Verwendung als diagnostisches Hilfsmittel bei der Identifizierung von Fusobakterien mittels Lysotypie liegen.
13. Für *Bacteroides fragilis* spezifische Phagen sind in mehreren Arbeiten als Indikatoren einer viralen bzw. fäkal-oralen Abwasserbelastung beschrieben. Phagen mit Spezifität für *Fusobacterium varium* könnten hierfür möglicherweise genauso gut oder sogar besser geeignet sein.
14. Die Untersuchung der Nukleinsäuren zeigte, daß alle Phagen ein DNS-Genom mit einer Gesamtgröße zwischen 43000 und 79000 bp besitzen. Dabei wurde nicht jede Phagen-DNS von allen verwendeten Restriktionsendonukleasen ausreichend verdaut. Mit den erzielten Ergebnissen war eine weitere Charakterisierung der Phagen insbesondere dahingehend möglich, daß mit Ausnahme von fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) die Eigenständigkeit der Phagen bewiesen werden konnte.

15. Die Strukturproteine aller 9 Phagen lagen in einer Größenordnung zwischen 30 und 138 kDa. Wie bereits bei der Analyse des Phagengenoms waren mit Ausnahme der bewiesenen identischen Phagen fv 83-554/3/3 (G) und fv 83-554/3/4 (I) alle anderen auch innerhalb desselben Morphotypes unterschiedlich, so daß diese als unabhängige Entitäten betrachtet werden müssen.

16. Möglicherweise können Phagen mit Spezifität für *F. varium* in der Bakteriengenetik als Transduktionssysteme Bedeutung erlangen. Dabei kann das Merkmal der Indolbildung zur sicheren Unterscheidung von Donatoren und Transduktanten herangezogen werden.

Tabellarischer Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Fabian Otto
Wohnort: 06108 Halle/Saale
Straße: Gottesackerstraße 3
Telefon: (0345-) 4722668
Geburtsdatum: 04.04.1973
Geburtsort: Halle/Saale
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1979-1989 Grundschule (POS) Wittekind Halle/Saale
1989-1991 Thomas-Müntzer-Gymnasium (EOS) Halle/Saale
1991 Abitur am Thomas-Müntzer-Gymnasium Halle/Saale

Zivildienst

01.04.1992- 31.07.1993 Zivildienst im St.Elisabeth-Krankenhaus Halle/Saale

Studium

1993-1999 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
1993-1995 Vorklinischer Abschnitt
1995-1998 Klinischer Abschnitt
05.09.1995 Ärztliche Vorprüfung
29.08.1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
22.09.1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
19.10.1998-07.02.1999 Praktisches Jahr, 1.Tertial, Abteilung für Gefäßchirurgie, St.4a

08.02.1999-30.05.1999	2.Tertial, Abteilung für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, St.7
31.05.1999-19.09.1999	3.Tertial, Abteilung für Innere Medizin, Gastroenterologie, St.4b alle: Krankenhaus St.Elisabeth und St.Barbara Halle/Saale

Ärztliche Ausbildung

01.11.1999-30.04.2001	Arzt im Praktikum, Krankenhaus St.Elisabeth und St.Barbara
seit 01.05.2001	Arzt in Weiterbildung für Innere Medizin Krankenhaus St. Elisabeth und St.Barbara

Halle, den 7.11.2001

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Halle, den 7.11.2001

Fabian Otto

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, erstmalig und ausschließlich an der Medizinischen Fakultät der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG um Eröffnung eines Promotionsverfahrens gebeten zu haben.

Halle, den 7.11.2001

Fabian Otto

Danksagung

Hiermit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. habil. C. Höhne, INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG für die freundliche Überlassung des Themas sowie für seine Hinweise, Unterstützung, Geduld und Ermutigungen bei der Erstellung dieser Arbeit ganz herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer.nat. A.S. Kekulé, Direktor des INSTITUTES FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG sei gedankt, daß diese Arbeit unter seiner Institutsleitung beendet werden konnte.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. W. Verhagen vom INSTITUT FÜR VIROLOGIE UND SEUCHENHYGIENE der MEDIZINISCHEN HOCHSCHULE HANNOVER für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Herrn Christoph Parthier, INSTITUT FÜR PROTEINBIOCHEMIE der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG, danke ich für seine Unterstützung bei der technischen Realisierung der Proteinanalysen sowie für seine wertvollen Hinweise bei der Gestaltung dieser Arbeit.

Weiterhin sei Herrn Dr. Fischer, INSTITUT FÜR MEDIZISCHE MIKROBIOLOGIE der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG für das Überlassen technischer Hilfsmittel und Materialien, seine nützlichen Hinweise und allzeit freundliche Beratung bei der Durchführung der DNS-Untersuchungen, gedankt.

Ein liebevoller Dank geht an meine Eltern Ingrid und Lienhard Otto, die mir mit der Ermöglichung meines Studiums die Grundvoraussetzungen auch für diese Arbeit schufen.

Allen weiteren Mitarbeitern des INSTITUTES FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE WITTENBERG möchte ich für die allzeit freundliche Unterstützung und Zusammenarbeit danken. Dies gilt insbesondere für Frau M. Koleczko, die mit uneingeschränkter Unterstützung, ihrem Interesse am Werdegang und mit der Schaffung einer herzlichen Arbeitsatmosphäre erheblich zum Gelingen beigetragen hat.