

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

<b>Tabelle Nr.</b>	<b>Beschreibung</b>
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>Sau3AI</i>
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	Einzelplaqueanreicherung
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 <sub>4</sub> -Puffer
ss	single-stranded/einzelsträngig
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethylethylendiamin
TM	Tris-MgSO <sub>4</sub> -Puffer
TMV	Tobacco Mosaic Virus
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan