

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<sup>®</sup> (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 <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> 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 <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> 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<sup>®</sup> 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  $-20^{\circ}$  C.

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

Bezeichnung	Erkennungssequenz
<i>Eco</i> RI	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTAAG↑...5'
<i>Hind</i> III	5'...A↓AGCTT...3' 3'...ATCGA↑A...5'
<i>Hinf</i> I	5'...G↓ANTC...3' 3'...CTAN↑G...5'
<i>Sau</i> 3A 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.