

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 kontraktilen 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 kontraktilen 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, kontraktilen 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 Fusobakterien 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 zehnmal 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 Lysspektrum 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 liegende 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 sporenlöse 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