

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der  
Veterinärmedizin

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

(Departmentsprecher: Univ. Prof. Dr. M. Hess)

Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln

(Leiterin: Univ. Prof<sup>in</sup>. Dr<sup>in</sup>. med. vet. Karin Schwaiger)

## **Lytische Eigenschaften aktivierter Prophagen aus *Salmonella* Isolaten**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Johannes Josef Künz

Wien, im August 2021

**BetreuerIn:**

Ao.Univ.-Prof<sup>in</sup>. Dr<sup>in</sup>. med. vet. Friederike Hilbert Dipl.ECVPH

(Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln)

**GutachterIn:**

Dr<sup>in</sup>. Martina Ludewig, Dipl. ECVPH

(Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie)

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Fragestellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1. <i>Salmonella</i> .....	3
2.2. Horizontaler Gentransfer .....	5
2.3. Bakteriophagen .....	8
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
3.1. Material .....	12
3.1.1. Geräte.....	12
3.1.2. Nährmedien.....	13
3.1.3. Bakterien und Phagen .....	14
3.2. Vorbereitungsarbeiten .....	15
3.2.1. Herstellung der Agarplatten .....	15
3.2.2. Anzüchten der Wirtsstämme .....	16
3.2.3. Propagieren der Prophagen .....	17
3.3. Bakteriophagensensitivitätstest.....	17
3.4. Bakteriophagenlysespektrum .....	18
<b>4. Resultate</b> .....	<b>20</b>
4.1. Bakteriophagensensibilitätstest.....	20
4.2. Bakteriophagenlysespektrum .....	23
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>25</b>
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>28</b>
<b>7. Abstract</b> .....	<b>29</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>30</b>
<b>9. Anhang</b> .....	<b>36</b>
<b>10. Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>42</b>
<b>11. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>43</b>
<b>12. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>43</b>

## 1. Einleitung und Fragestellung

Salmonellen gehören weltweit zu den wichtigsten Krankheitserregern von Mensch und Tier. Die Ansteckung mit Salmonellen erfolgt meist über kontaminierte Lebensmittel, oder den direkten Kontakt mit infizierten Tieren (MORENO SWITT et al., 2013). In der EU ist die Salmonellose die zweithäufigste gastrointestinale Erkrankung beim Menschen (EFSA u. ECDC, 2021). Was Lebensmittel betrifft, so sind die meisten Übertragungsfälle durch Eier, Schweinefleisch, Backwaren und Fertigprodukte zu verzeichnen, aber auch durch andere Nahrungsmittel wie Hühnerfleisch, Milch, Rindfleisch, Gemüse, Obst und andere Produkte, kann eine Salmonellose übertragen werden (EFSA u. ECDC, 2021). *Salmonella enterica* umfasst bereits mehr als 3000 Serovare (El-Sharkawy et al. 2017), wobei sich die Häufigkeit der vorkommenden Serovare durch geografische Region, tierische Quellen und serovarspezifische Präferenzen unterscheidet (MORENO SWITT et al., 2013). Der primäre Lebensraum von Salmonellen ist der tierische Wirt, doch können Salmonellen auch außerhalb des Wirtes längerfristig überleben, bis sie in einen neuen Wirt aufgenommen werden (WINFIELD u. GROISMAN, 2003).

Bakterien können genetische Informationen durch einen horizontalen Gentransfer austauschen. Zu den Mechanismen des horizontalen Gentransfers gehören: Konjugation, Transformation und Transduktion (COLAVECCHIO et al., 2017). Der Mechanismus, der für diese Arbeit von Relevanz ist, ist jener der Transduktion. Bei diesem erfolgt der Gentransfer durch Bakteriophagen, kurz Phagen genannt. Phagen sind Viren, die Bakterien als Wirtszelle befallen. Sogenannte lysogene Phagen können ihr Genom in das Wirtsgenom einschleusen und werden dann als sogenannte Prophagen auf die Tochterzellen weiter vererbt (spezifische Transduktion). Es kann aber auch durch einen Phagen bakterielle DNA aufgenommen werden (zufällig) und bei einem nächsten Zyklus auf eine andere Bakterienzelle übertragen werden. Dies wird als generalisierte Transduktion bezeichnet (TORRES-BRACELÓ et al., 2018).

Durch die Entdeckung der Antibiotika wurde das Interesse an der Bakteriophagenforschung geschmälert. Einzig in der damaligen Sowjetunion wurde die antibakterielle Wirkung der Phagen weiter erforscht. Durch die steigenden Antibiotikaresistenzen bei bakteriellen Krankheitserregern rücken Bakteriophagen in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus als

alternative Therapie zu Antibiotika. In Osteuropa und den Ländern der ehemaligen Sowjetunion werden diese zur Therapie gegen bakterielle Erkrankungen eingesetzt. Als Vorteil dieser Therapie erweist sich, dass die meisten Bakteriophagen ein sehr enges Wirtsspektrum besitzen und damit nur eine Bakterienspezies, oder sogar -subspezies infizieren. Durch die hochspezifische Wechselwirkung zwischen Bakterienzelloberflächenrezeptoren und Phagenanheftungsstrukturen können sie oft nur eine begrenzte Anzahl einer einzelnen Bakterienart infizieren (DRULIS-KAWA et al., 2015). Es wird aber auch über Bakteriophagen berichtet, welche ein weites Wirtsspektrum besitzen. Dies konnte zum Beispiel in einem Versuch gezeigt werden, in welchem eine Salmonellenphage einen *Escherichia coli* Stamm infizierte (MAHMOUDA et al., 2018).

Ziel der Studie ist es herauszufinden, inwieweit aktivierte *Salmonella*-Prophagen in der Lage sind, unterschiedliche *Salmonella* Serovare, *Enterobacteriaceae* und *Campylobacter jejuni* zu lysieren. Zunächst soll festgestellt werden, welche Phagen ein größeres Wirtsspektrum haben. Dafür werden sie auf verschiedenen *Salmonella* Serovaren, *Enterobacteriaceae* und *Campylobacter* auf Lyse getestet. Anschließend werden jene mit einem breiteren Wirtsspektrum auf weiteren *Salmonella*, *E.coli* und *Yersinien* weiter getestet.

Dazu wurden folgende Forschungsfragen formuliert:

- Welche Phagen haben ein größeres Wirtsspektrum?
- Können jene Phagen mit einem größeren Wirtsspektrum auch andere *Enterobacteriaceae* lysieren?

Vor dem Hintergrund der Ergebnisse aus der Literatur wird erwartet, dass ein Teil der *Salmonella*-phagen weitere *Salmonella* lysieren können. Die Möglichkeit besteht, dass diese Phagen auch *E.coli* lysieren können. Durch die genetische Ähnlichkeit mit *Yersinien*phagen könnte auch bei *Yersinien* eine Infektion möglich sein.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. *Salmonella*

Die Gattung *Salmonella* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Sie sind Gram-negative, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende, Oxidase-negative und Katalase-positive Stäbchen. Fast alle Salmonellenarten können sich mit Hilfe von peritrichen Flagellen fortbewegen. Salmonellen werden in folgende zwei Arten unterteilt: *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*. Bei *Salmonella enterica* werden zusätzlich 6 Unterarten unterschieden. Die Begriffe „Serovar“ und „Serotyp“ sind bei *Salmonella* synonym zu verwenden, wobei sich das Wort „Serovar“ stärker durchsetzt (RYAN et al., 2017). Die verschiedenen Serovare werden anhand ihrer Antigenpräsentation, ihrer Wirtsspezifität und dem klinischen Erscheinungsbild, welches sie bei einer Infektion verursachen, unterscheiden (GAL-MOR et al., 2014). Bis heute wurden mehr als 3000 verschiedene Serovare gezählt (EL-SHARKAWY et al., 2017).

Weiters werden typhoide und nicht-typhoidale *Salmonella* (NTS)-Typen unterschieden. Die typhoidalen Serovare, *Salmonella enterica* Serovar Typhi (*S. Typhi*) und *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi (außer Paratyphi B dT, der auch in Geflügel vorkommt), sind Krankheitserreger, die sich auf den Menschen beschränken und dort das enterische (typhoide) Fieber auslösen. Diese systemische Erkrankung zeichnet sich durch starkes Fieber, Bauchschmerzen und unstillbaren Durchfall aus. Dabei kann es zu einer permanenten Besiedelung verschiedener Organe kommen und diese Personen können den Erreger intermittierend ausscheiden. Um dies zu verhindern, ist eine antibiotische Therapie angezeigt. *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis und *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium zählen zu den NTS. Sie haben ein breites Wirtsspektrum, welches sich vom Menschen über Rinder, Schweine, Geflügel und Reptilien etc. erstreckt. In der Regel verursachen sie eine selbstlimitierende Gastroenteritis, aber bei jungen, alten und immunsupprimierten Wirten (YOPI) können sie auch eine systemische Infektion und Bakteriämie auslösen. Sehr selten kommt es auch bei gesunden Personen zu typhoiden Verläufen (LAROCK et al., 2015). NTS treten weltweit auf, wohingegen die typhoidale Form in verschiedenen Entwicklungsländern, aber auch in Ländern mit Wasserknappheit endemisch ist, da es dort an sauberem Wasser bzw. sanitären Anlagen mangelt (GAL-MOR et al., 2014). In der EU ist die Salmonellose hinter der

Campylobacteriose die zweithäufigste gastrointestinale Infektion beim Menschen und spielt eine große Rolle bei lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen. 2019 wurden in der EU 87.923 Fälle von Salmonellose gemeldet (EFSA u. ECDC, 2021). Bis zum Jahr 2015 waren die Infektionen rückläufig und sind seit dieser Zeit stabil. Die häufigsten Ursachen für eine lebensmittelbedingte Salmonellose sind der Verzehr von Eiern und Eiprodukten, gefolgt von Backwaren, Schweinefleisch und jenen Produkten und Gerichten, bei welchen pflanzliche und tierische Produkte gemeinsam zubereitet werden (EFSA u. ECDC, 2021).

Für Salmonellen beträgt das Temperaturoptimum für ein Wachstum 37 °C, wobei aber auch bei bestimmten Isolaten ein Wachstum ab 7 °C bis zu 54 °C beobachtet wird. Beim pH-Wert befindet sich das Optimum bei 6,5 bis 7,5. Salmonellen können aber auch bei einem pH-Bereich von 3,8-9,5 überleben (RYAN et al., 2017). Der primäre Lebensraum von *Salmonella* ist der tierische Wirt, in dem sie den Großteil ihres Lebens verbringen. Dieser bietet durch eine konstante Temperatur und eine große Menge an freien Aminosäuren und Zuckern die idealen Bedingungen für das Wachstum der Bakterien. Salmonellen wurden schon bei einer Vielzahl von Tierarten isoliert.

Der Mensch infiziert sich meist durch ungekochte tierische Lebensmittel wie Fleisch und Eier. Es ist aber auch eine Infektion durch Obst und Gemüse möglich, welches mit erregerrhaltigem Dünger in Berührung kam. Außerdem sind Reptilien als *Salmonella*-Reservoir bekannt und die Besitzer von solchen Tieren sind dementsprechend einem höheren Infektionsrisiko ausgesetzt (WINFIELD u. GROISMAN, 2003). 10 % der Menschen, die mit *S. Typhi* infiziert und nicht behandelt wurden, scheiden den Erreger bis zu drei Monate nach der Infektion im Stuhl aus; 1 bis 4 % werden sogar zu chronischen, asymptomatischen Trägern und scheiden *Salmonella* länger als 12 Monate lang aus. Bei chronischen Trägern wird vermutet, dass *S. Typhi* in der Gallenblase persistiert. Gallensteine fördern eine Besiedelung, da sie die Biofilmbildung erhöhen und somit die Erreger vor dem Immunsystem schützen. Bei NTS scheiden Erwachsene nach der Infektion im Durchschnitt einen Monat und Kinder unter fünf Jahren sieben Wochen lang *Salmonella* aus (GAL-MOR et al., 2014).

Vögel und Fliegen tragen dazu bei, Salmonellen über weite Strecken zu verteilen. Salmonellen können in Fliegen bis zu vier Wochen überleben, was erstaunlich ist, da sich die physikalisch-chemischen Bedingungen stark von Wirbelwirten unterscheiden. Darüber hinaus werden

Salmonellen auch aus Wasserquellen isoliert, welche als Erregerreservoir die Übertragung zwischen Wirten unterstützen können. Ebenso können sie in Gewässern mit hohen Salzgehalten wie Meerwasser überleben. Der hohe Nährstoffgehalt in Abwässern fördert das Überleben von Salmonellen, aber auch in nicht gedüngten Böden können *Salmonella* lange überleben. Wenn Abwasser, Düngemittel oder andere mit Salmonellen kontaminierte Flüssigkeiten durch den Boden sickern, werden die Salmonellen herausgefiltert. In diesem Ökosystem kann *Salmonella* bis zu einem Jahr überleben und sich unter Umständen auch vermehren. Sogar in für Salmonellen ungünstigen Bedingungen sind sie bis zu 15 Tage überlebensfähig. Mit der Fähigkeit ständig in der Umwelt und im Wirt vorhanden zu sein, haben Salmonellen einen zyklischen Lebensstil entwickelt, welcher sich ideal für die Vermehrung und Verteilung des Erregers eignet (WINFIELD u. GROISMAN, 2003).

## **2.2. Horizontaler Gentransfer**

Evolution kann nur durch die Änderung alter und die Entwicklung neuer Funktionen voranschreiten. Bakterien besitzen ein weites Spektrum an Möglichkeiten ihr Erbgut zu verändern. Durch eine schnelle Verdopplungszeit mit exponentiellem Wachstum können Mutationen sehr schnell zu genetischen Veränderungen führen. Zusätzlich bietet der horizontale Gentransfer, durch die Aufnahme von ganzen Funktionseinheiten in Form von freier DNA, Plasmiden, konjugierten Transposonen oder Phagen aus anderen Quellen (Bakterien) die Möglichkeit einer schnellen Anpassung. Über den horizontalen Gentransfer können Stoffwechselwege oder komplexe Oberflächenstrukturen erworben werden (BRÜSSOW et al., 2004).

Die Funktionseinheiten die beim horizontalen Gentransfer, auch als lateraler Gentransfer bezeichnet, übertragen werden, werden auch mobile genetische Einheiten (MGEs) genannt (GYLES u. BOERLIN, 2014). Die Möglichkeit zum horizontalen Gentransfer ist an folgende Anforderungen gebunden: Erstens muss es möglich sein, die Spender-DNA an die Empfängerzelle abzugeben; zweitens müssen die erworbenen MGEs in das Erbgut der Empfängerzelle eingebaut werden; drittens müssen die erhaltenen Gene so exprimiert werden, dass sie für die Empfängerzelle angemessen sind. Dies kann durch Konjugation,

Transformation und Transduktion erfüllt werden (Abb. 1). Für die Konjugation benötigt es den physischen Kontakt zwischen der Spender- und Empfängerzelle. Die DNA wird üblicherweise über ein autotransferables, andererseits auch durch zu mobilisierende Plasmide, oder durch chromosomaler DNA-Sequenzen, die ebenfalls durch Plasmide übertragen werden, übernommen. Diese Art der Informationsübertragung ermöglicht auch den (seltenen) Austausch zwischen verschiedenen Domänen, z. B. Bakterien und Pflanzen oder Bakterien und Hefen (OCHMAN et al., 2000). Bei der Transformation wird freie DNA durch komplexe und energiebedürftige Prozesse in ein Bakterium aufgenommen. Die Transduktion erfolgt mit Hilfe von Viren, den sogenannten Bakteriophagen, kurz Phagen. Phagen sind Viren, welche ausschließlich Bakterien befallen und in ihnen ihre DNA replizieren. Durch den versehentlichen Einbau von bakterieller Erbinformation in den Phagenkopf, kann Erbgutinformation mittels der Phagen auf andere Bakterien übertragen werden. Mit dieser Methode kann jede Region vom bakteriellen Chromosom übertragen werden. Sie wird daher als generalisierte Transduktion bezeichnet. Mittels gemäßigten oder lysogenen Phagen kann eine spezialisierte Transduktion erfolgen. Lysogene Phagen werden für einige Zeit in das Bakterienchromosom integriert. Durch unvollständige Exzision des Phagengenoms verbleiben im Wirtsgenom Abschnitte, welche als neue transkribierende Erbinformation bestehen bleiben, wodurch die darin codierenden Eigenschaften wie z.B. Virulenzgene dem Bakterium erhalten bleiben (GYLES u. BOERLIN, 2014).

Das Zusammenspiel zwischen Phagen und Bakterien ist sehr komplex. Um ein Moron (Funktionsgen in einem MGE) richtig exprimieren zu können, muss das Bakterium ein geeignetes Chaperon und die richtigen Regulatoren besitzen, da diese nicht von der Prophage kodiert werden. Diese Voraussetzung stellt eine deutliche Barriere für die Ausbreitung der Moronen dar. Bakterien können funktionelle Prophagen durch Selbstheilung auch wieder aus ihrem Genom verlieren. Um den selektiven Vorteil eines Morons behalten zu können, schützen sich Bakterien vor der Phagenlyse und ermöglichen so eine funktionelle Verbindung zwischen der Entwicklung von Prophagen und Bakterien. Die Verbreitung solcher Morone scheint aber oft auf eine Art bzw. eine eng verwandte Art des Wirtes beschränkt zu sein. Das liegt vermutlich daran, dass z.B. Virulenzfaktoren bereits sehr spezifisch ausgelegt sind und ein anderes Moron in diesem Netzwerk nicht funktionieren würde. Zudem trägt nicht jede Prophage ein gesamtes Moron (BRÜSSOW et al., 2004).

Als Beispiel dafür, wie die Aufnahme von Moronen die Biologie von Bakterien beeinflusst hat, eignet sich *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Dieser Bakteriensorvar hat sich an Nischen in der Umwelt und im Darm verschiedener Tierarten angepasst. Ein Grund dafür sind die Effektorproteine vom Typ III, welche durch bestimmte Prophagen übertragen werden können. Diese Proteine gehören zu einer bestimmten Klasse von Virulenzfaktoren und spielen bei der Pathogenese von Salmonellen eine zentrale Rolle (BRÜSSOW et al., 2004). Phagen die mit den Virulenzgenen für diese Typ III Effektorproteine assoziiert sind, sind z.B. Fels-1, Fels-2, Gifsy-1, Gifsy-2 und SopEΦ (PANG et al., 2013).

Im Vergleich von genomischen Regionen bei globalen endemischen *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Stämmen, wurden hauptsächlich in den Prophagenregionen Variationen beobachtet (NGOI et al., 2018). Die Anzahl von mobilen Elementen durch Phagen kann ein Grund für den Erfolg in der Verbreitung und Anpassungsfähigkeit von *Salmonella* sein, die in den verschiedenen Sorvaren vorhanden sind (D'ALESSANDRO et al., 2018).

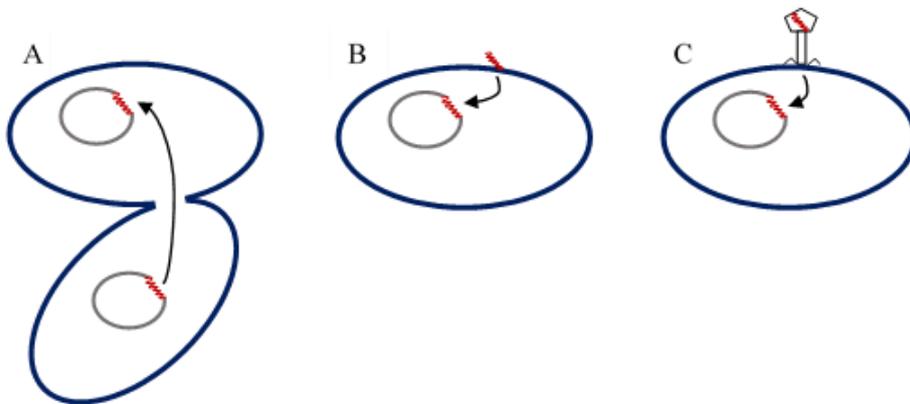


Abb. 1: (A) Bei der Konjugation wird durch direkten Kontakt das Erbgut aufgenommen. (B) Durch Transformation wird freies Erbgut direkt über die Zellwand aufgenommen. (C) In der Transduktion injiziert die Phage ihr Genom, welches dann aufgenommen werden kann.

### 2.3. Bakteriophagen

Bakteriophagen sind Viren, welche Bakterien infizieren. Sie sind für die Vermehrung an den Stoffwechsel von Bakterien gebunden. Ganze Ökosysteme können durch sie nachhaltig verändert werden, da sie bestimmte Bakterienpopulationen auslöschen können. Zusätzlich vermitteln sie den lateralen Gentransfer, können den Wirtsstoffwechsel verändern und durch Lyse die Bestandteile des Genoms im Umfeld verteilen. Die Infektion mit Phagen kann jedoch auch negative Auswirkungen für den Menschen haben, wie etwa die Verteilung von Antibiotikaresistenzen und Pathogenitätsfaktoren (AL-SHAYEB et al., 2020).

Abgesehen von unterschiedlichen Wirts- und Umweltfaktoren hängt die Reproduktionsrate hauptsächlich von drei Faktoren ab: erstens von der Adsorptionsrate (Rate in welcher die Phagen irreversibel an die Wirtszelle binden, diese Bindung ist der Beginn der Infektion), zweitens von der Latenzzeit (Zeit ab dem Infizieren der Wirtszelle bis zur Freisetzung der neuen Phagen) und drittens von der Burst-Größe (Menge der Viren, welche pro infizierter Zelle freigesetzt werden). Um erfolgreich überleben zu können, müssen Phagen ein Gleichgewicht zwischen der Reproduktionsgröße und gleichzeitigem Erhalt der Wirtspopulation erreichen, wofür ein ausbalanciertes Verhältnis dieser drei Faktoren notwendig ist (KEEN, 2014). Anhand ihres Lebenszyklus können Phagen in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: lytische Phagen (virulente) und lysogene Phagen (gemäßigte) (Abb. 2). Ein gewisser Teil von Phagen durchläuft auch einen sogenannten pseudolysogenen Zyklus, in welchem sie sich nicht in das Chromosom des Wirts integrieren, sondern nur als Plasmide in der Bakterienzelle vorliegen. Der lytische Zyklus beginnt mit der irreversiblen Bindung und der darauffolgenden Injektion des Phagengenoms in die Wirtszelle. Es beginnt die Transkription von Phagengenomen und die Replikation des Phagengenoms. Dabei werden die viralen Proteine synthetisiert, zu den Phagenbestandteilen Kapsiden (Köpfen) und Schwänzchen (bei Schwanzphagen) zusammengesetzt und das Phagengenom darin verpackt. Abschließend wird das Protein Holin gebildet, wodurch es zur Zelllyse und somit zur Freisetzung der neu gebildeten Phagen kommt. Beim lysogenen Zyklus haben die Phagen zwar auch die Eigenschaften, um den lytischen Zyklus zu durchlaufen, anstelle dessen wird aber nach Eindringen in die Wirtszelle ihr Genom in das Chromosom des Bakteriums integriert und sie werden somit zu Prophagen. Dieser Zyklus wird durch einen spezifischen Phagenrepressor ermöglicht, welcher die Transkription der

meisten Phagengene, einschließlich der für den Lysezyklus, hemmt. Dieser Zustand kann unendlich lange beibehalten werden und wird in der Regel nur durch eine Schädigung der DNA durchbrochen. Je nach Phage und Wirt kann aber auch ein gewisses Maß an spontaner Induktion von Prophagen auftreten. Bakterien, welche Prophagen beherbergen, werden als „Lysogen“ bezeichnet und sind oft gegen andere lytische und lysogene Phagen immun (FORTIER u. SEKULOVIC, 2013). Dieses Einbringen von neuen Genomen kann sich positiv auf die Fitness des Wirtes auswirken, da diese Gene zum Beispiel für Resistenzgene kodieren oder aber für Gene, die die Virulenz steigern (CHEN et al., 2005).

Wie die Phage mit dem Bakterium interagieren kann, hängt von den Proteinen am Phagenschwanz und den Rezeptoren auf dem Bakterium ab. Diese Rezeptoren sind Proteine oder Lipopolysaccharide (LPS). FhuA, TolC, BtuB, OmpC, Vi-Kapselantigen, O-Antigen von LPS und Flagellen sind als Salmonellen-Phagenrezeptoren bekannt. Die Präferenz für verschiedene Flagellenrezeptoren unterscheidet sich zwischen den Phagen und ist nicht nur von flagellotropen Phagen, sondern auch von der Motilität und Richtungsrotation der Flagellen selbst abhängig (CHATURONGAKUL u. OUNJAI, 2014). Ein Grund für die Verhinderung der Aufnahme von Phagen bei *Salmonella* Typhimurium könnte die komplexe Natur vom *Salmonella* Typhimurium LPS sein (SHIN et al., 2012). Die meisten Phagen haben ein hochspezifisches und empfindliches Spektrum an möglichen Wirtsbakterien (TANG et al., 2019). Durch dieses enge Wirtsspektrum eignen sie sich als Biokontrollmittel gegen pathogene Erreger. Das Vorkommen dieser Phagen ist abhängig von dem Vorkommen ihres Wirtes (PETSONG et al., 2019). Es gibt aber auch Salmonellenphagen, welche ein breites Wirtsspektrum zeigen und einen sogenannten „Wide-host-range“ (WHR) besitzen. Das könnte Berichten zufolge darauf zurückzuführen sein, dass Phagen ein weiteres Wirtsspektrum zeigen, wenn sie an Orten mit geringer Wirtsdichte vorkommen (HUANG et al., 2018). Auch wurde beobachtet, dass eine schnellere Replikationsfähigkeit mit einem engen Wirtsspektrum verbunden ist und eine langsamere Replikation für ein breiteres Spektrum spricht. Die Geschwindigkeit der Replikation nimmt mit der Größe des Genoms ab, kleinere Größen werden schneller repliziert als größere (KEEN, 2014). Es konnte in Versuchen nachgewiesen werden, dass Salmonellenphagen *Escherichia coli* lysieren können (KIM et al., 2018; MAHMOUDA et al., 2018). Dies konnte auch umgekehrt mit *Escherichia coli* Phagen auf Salmonellen beobachtet werden (AMARILLAS et al., 2016; GAMBINO et al., 2020; PHAM-KHANH et

al., 2019). In einer anderen Studie wurde eine *Escherichia coli* Phage auf anderen Spezies getestet. Die Phage konnte zwar keine anderen Spezies, auch keine der *Enterobacteriaceae*, lysieren, eine Genomanalyse zeigte aber, dass die Phagenschwanzgene funktionelle Domänen enthielten, die den Genen von Salmonellenphagen und Genen von *Pseudomonas* und *Neisseria* sehr ähnlich waren (PENG u. YUAN, 2018). Genetische Homologien zwischen Salmonellenphagen und Yersinienphagen konnten auch in verschiedenen Studien festgestellt werden (LIN, 2016; SALEM et al., 2021; SCHWUDKE et al., 2007; ZHAO et al., 2019). Es gibt auch Phagen wie PRD1, die ein breites Lysespektrum von *Enterobacteriaceae* inkl. *Pseudomonas aeruginosa* aufweisen (GAMBINO et al., 2020).

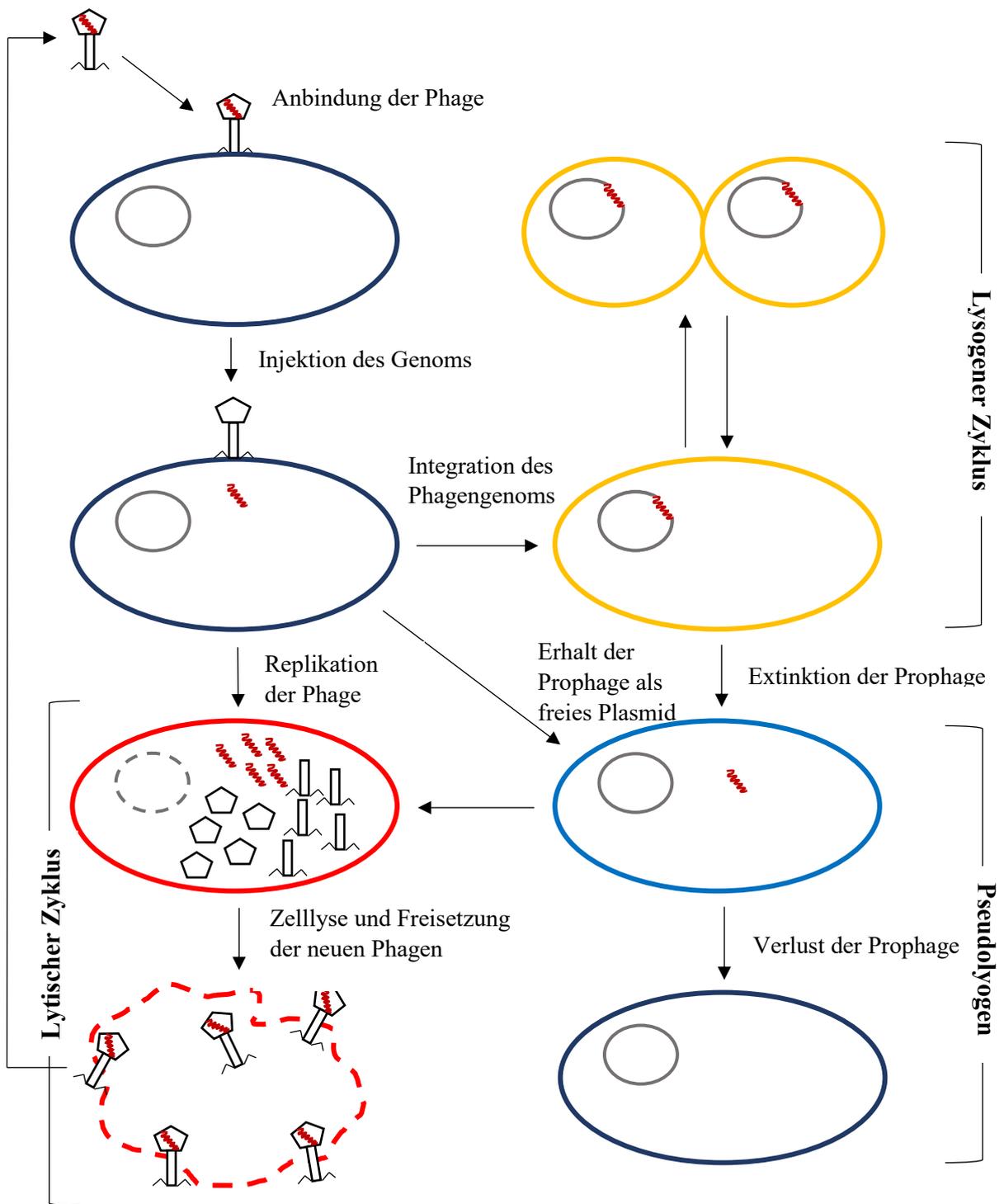


Abb. 2: modifiziert nach FORTIER u. SEKULOVIC, 2013. Verschiedene Lebenszyklen von Phagen. Beim lytischen Zyklus kommt es zur Replikation der Phage, die mit der Zellyse und Freisetzung der neuen Phagen endet. Im lysogenen Zyklus wird das Phagen-genom in das Erbgut des Wirtes integriert, bis es entweder wieder aktiviert wird und in den lytischen Zyklus übergeht oder aus der Zelle ausgeschlossen wird. Beim pseudolysogenen Zyklus bleibt das Phagen-genom frei im Zytoplasma erhalten und kann irgendwann lytisch werden oder verloren gehen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Geräte

- Inkubatoren
  - Inkubator (Revco Ultima)
  - Inkubator (Mettler)
- Sterile Einmalpipetten (Greiner BioOne)
  - 1000µl (686290)
  - 100µl (772288)
  - 10µl (765288)
- Glaspipetten
- Automatische Pipettierhilfe (Greiner BioOne)
- Reaktionsgefäß (Greiner BioOne)
  - 2ml 623201
- Vortexer (IKA MS2 Minishaker)
- Petri Schalen (LabXperts, STM 101VR20)
- Glaseprovetten
- Autoklav (Dampfsterilisator Multicentral BE)
- Wärmeplatte
- Mikroskop
- Magnetrührer (IKA KMO 2 electronic, Janke & Kunkel)
- Glasflaschen
- Impfösen (Becker)
- Thermoschüttler
- Sterile Spateln
- Bunsenbrenner (Schütt)
- Zentrifuge (Sigma)
- 20ml Spritzen, B. Braun Melsungen AG

- 0,2µm Filter VWR International™ North American
- Aqua. bidest

### 3.1.2. Nährmedien

- LB Agar Miller (Thermo Scientific™ Oxoid 10081163)
- LB Broth (VWR International OXOICM0996B)
- Agarose (VWR International 732-2789)
- MH - Broth (Oxoid CM 0405)
- ssLB Agar (semi-solid LB Agar, 0,8% Agar)
- NZCYM Agar (VWR Life Science; J865-500G)
- ssNZCYM Agar (semi-solid NZCYM Agar, 0,8% Agar)
- CCDA Agar (CM0739; Oxoid)
- GKS-Agar (1.05463.0500; Merck)
- LB-Agar mit Antibiotika
  - Ampicillin 50µg/ml
  - Chloramphenicol 32µg/ml
  - Streptomycin 500µg/ml
  - Sulfamethoxazol 2000µg/ml
- PI-Buffer (Prophage Induction Buffer):
  - 5mM CaCl<sub>2</sub>
  - 100mM MgCl<sub>2</sub>
  - Mueller Hinton Broth (CM0405; Oxoid) 21g in 1 Liter bidestilliertem Wasser

### 3.1.3. Bakterien und Phagen

Es wurden aktivierte Prophagen (SATTLER, 2021; TROFEIT, 2021) von 40 *Salmonella* Typhimurium und 4 *Salmonella* Enteritidis Isolaten auf 11 verschiedenen *Salmonella* Isolate (1 *S. Typhimurium*, 1 *S. Enteritidis*, 1 *S. Blockley*, 1 *S. Heidelberg*, 1 *S. Paratyphi*, 1 *S. Typhimurium* geißellos, 1 *S. Virchow*, 1 *S. Hadar*, 1 *S. Rissen*, 1 *S. Kentucky*, 1 *S. B-Gruppe*), 7 *Enterobacteriaceae* (1 *Escherichia coli*, 1 *Klebsiella pneumoniae*, 1, *Citrobacter freundii*, 1 *Erwinia herbicola*, 1 *Proteus mirabilis*, 1 *Proteus vulgaris*, 1 *Serratia marcescens*) und 3 *Campylobacter jejuni* Isolate auf Lyse getestet. Die aktivierten Typhimurium Prophagen, die mehr als 4 Isolate lysieren konnten, und die Enteritidis Prophagen, die mindestens 2 Isolate lysierten, wurden weiter verwendet und auf jeweils 50 *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* Isolate sowie auf weiteren 40 *Salmonella* Isolaten unterschiedlicher Serovare auf Lyse überprüft.

Die genaue Auflistung findet sich im Anhang (siehe Tabellen 4-7).

## **3.2. Vorbereitungsarbeiten**

### **3.2.1. Herstellung der Agarplatten**

#### **LB-Agarplatten**

Für die Herstellung der LB-Agarplatten wurden 7,5g LB-Agar (Thermo Scientific™ Oxoid™; Agar Bacteriological; 10351303) und 12,5g LB Broth (Thermo Scientific Oxoid; Luria Bertani Broth (Miller)-Oxoid; CM0996B) pro 500ml H<sub>2</sub>O eingewogen. In einer Glasflasche wurde die Suspension mittels Magnetrührer (IKA KMO 2 electronic; Janke & Kunkel) homogenisiert. Die Suspension wurde autoklaviert, auf 50°C abgekühlt und anschließend wurden jeweils 20ml in eine sterile Petrischale (STM 101VR20, LabXperts) gegossen. Diese wurden kurz geschwenkt und stehen gelassen, bis sich der Agar abgekühlt und sich verfestigt hatte.

#### **CCDA-Platten**

Für die Herstellung der CCDA-Platten wurde 22,75g Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base (CM0739; Oxoid) eingewogen und bis zu 500ml mit dem bi-distillierten Wasser aufgefüllt und autoklaviert. Jeweils 20ml der auf 50°C abgekühlten Suspension wurden in eine sterile Petrischale (STM 101VR20, LabXperts) gegossen. Die Petrischalen wurden daraufhin kurz geschwenkt und stehen gelassen, bis sich der Agar abgekühlt und sich verfestigt hatte.

#### **NZCYM-Agar**

Für die Herstellung des NZCYM-Agar wurden 23,1 g NZCYM Broth (VWR Life Science; J865-500G) und 15g Agar Bacteriological (Thermo Scientific™ Oxoid™; 10351303) eingewogen und mit 1L bi-distilliertem Wasser aufgefüllt und autoklaviert. Jeweils 20ml der auf 50°C abgekühlten Suspension wurden in eine sterile Petrischale (STM 101VR20, Lab Xperts) gegossen und gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden stehen gelassen, bis sich der Agar verfestigt hatte.

#### **Gesamtkeimzahlagar (GKZ)**

Für die Herstellung der Gesamtkeimzahlagarplatten wurden 22,5g Plate Count Agar (Merck; 1054630500) eingewogen und bis auf 1000ml mit bi-distilliertem Wasser aufgefüllt

homogenisiert und autoklaviert. Danach wurde das Medium bis auf 50°C abgekühlt und in sterile Petrischalen (STM 101VR20, LabXperts) gegossen.

### **Semisolider LB-Agar (ssLBA)**

Für die Herstellung von ssLBA wurden 7,5g LB Broth (Thermo Scientific Oxoid; Luria Bertani Broth (Miller)-Oxoid; CM0996B) und 2,4g Agar Bacteriological (Thermo Scientific™ Oxoid™; 10351303) in 300 ml bi-distilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde die Suspension in sterile Glasröhrchen überführt (4ml pro Röhrchen), bis auf Raumtemperatur abgekühlt und im Kühlschrank aufbewahrt.

### **Semisolider NZCYM-Agar (ssNZCYMA)**

Für die Herstellung von ssNZCYMA wurden 6,9g NZCYM Broth (VWR Life Science; J865-500G) und 2,4g (Thermo Scientific™ Oxoid™; Agar Bacteriological; 10351303) in 300ml bi-distilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde die Suspension in sterile Glasröhrchen überführt (4ml pro Röhrchen), bis auf Raumtemperatur abgekühlt und im Kühlschrank aufbewahrt.

### **3.2.2. Anzüchten der Wirtsstämme**

Für die drei Campylobacterstämme wurde jeweils eine Kolonie auf einer CCDA-Platte ausgestrichen und bei 42°C mikroaerophil für 48h inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein Teil der Kolonien von der Platte entnommen und in jeweils 10ml MH-Broth + 10M CaCl<sub>2</sub> + 10M MgSO<sub>4</sub> aufgelöst, bis eine dem McFarland Standard 5 entsprechende Trübung der bakteriellen Suspension erreicht war.

Von den restlichen bakteriellen Stämmen wurde jeweils eine Kolonie auf GKS-Platten ausgestrichen und bei 30°C aerob für 24h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde ein Teil der Kolonien von der Platte entnommen und in jeweils 10ml MH-Both + 5M CaCl<sub>2</sub> + 100mM MgSO<sub>4</sub> aufgelöst, bis sich eine Trübung der bakteriellen Suspension auf McFarland Standard 2 eingestellt hatte.

Alle 50 *E. coli*, Yersinien und 40 Salmonellen wurden je auf einer LB-Platte ausgestrichen und bei 30 oder 37°C für 24h inkubiert.

### 3.2.3. Propagieren der Prophagen

Es wurden 100µl vom Phagenlysat, 1900µl bakterieller Suspension von WT14028s bzw. DSM17420 und 24µl 1Mol CaCl<sub>2</sub> zu 4ml ssLBA pipettiert, gevortext und auf einer LBA-Platte ausgegossen. Dieser Vorgang wurde mit 10µl Phagenlysat wiederholt. Es wurde gewartet, bis die Platten ausgehärtet waren und anschließend bei 30°C für 24h inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Anzahl der Plaques gezählt (bei hohen Zahlen geschätzt) und notiert. Anschließend wurden 4ml SM-Puffer auf die Platte pipettiert, mit einer Drigalsky-Spatel die oberste Schicht mit den Plaques zerstört und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit in eine 2ml Tube pipettiert und für 5min bei 10.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Filter von 0,2µm Durchmesser in ein neues 2ml Eppendorf Röhrchen steril filtriert. Das gewonnene Phagenlysat wurde so auf eine Phagenkonzentration von ca. 10<sup>4-8</sup> PFU/ml gebracht und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.3. Bakteriophagensensitivitätstest

Für den Test wurden die Glasröhrchen mit 4ml ssLBA oder ssNZCYMA 10 min lang gekocht, bis sich der Agar verflüssigt hatte. Die Röhrchen wurden dann in einem Thermoblock bis 50°C abgekühlt und bei dieser Temperatur warmgehalten. Zu den 4ml ssAgar wurden 24µl 1M CaCl<sub>2</sub> hinzu pipettiert und anschließend gevortext.

Für die Bestimmung der lytischen Aktivität der Bakteriophagen in *Campylobacter* wurden ssNZCYMA und NZCYM-Agar verwendet. Für die anderen Bakterien wurden ssLBA und LB-Agar verwendet. Dafür wurden 2ml der bakteriellen Suspension in MH-Bouillon mit einer voreingestellten Trübung (McFarland Standard 5 für *Campylobacter* und McFarland Standard 2 für die restlichen getesteten Bakterien) zu 4ml mit 24µl 1M CaCl<sub>2</sub> komplementierter ssAgar-Lösung dazu pipettiert, gevortext und auf die entsprechende Platte ausgegossen. Nachdem die Platten polymerisiert waren, wurden 2µl der Phagensuspension zupipettiert, wobei mit der

Pipettenspitze der obere Layer des Agars angestochen wurde. Bei der Platte mit dem *Salmonella* Typhimurium Stamm ATCC14028 (14028<sup>WT</sup>) wurden nur die *Salmonella enteritidis* Prophagen aufgetragen. Umgekehrt wurde bei den Platten mit dem *Salmonella* Enteritidis Stamm DSM 17420 die Prophagen von *Salmonella* Typhimurium aufgetragen.

Zusätzlich zu den Proben wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle wurden die oben genannten Wirtsstämme ohne Überstand verwendet: 1ml von dem Wirtsstamm mit der entsprechenden Trübung in MH- Bouillon plus 1ml MH Bouillon.

Die Platten wurden für eine Stunde aufrecht in den Inkubator gestellt und danach umgedreht. Die Platten mit *Campylobacter* wurden bei 42°C unter mikroaerophiler Atmosphäre (5% O<sub>2</sub> and 10% CO<sub>2</sub>) für 48h inkubiert. Die Platten mit den anderen Bakterien wurden bei 30°C aerob 24h inkubiert.

Die Plaques wurden nach 24h bzw. 48h auf den Platten ausgezählt. Bei nicht makroskopisch sichtbaren Plaques wurde mit Hilfe eines Mikroskops genau nachkontrolliert, ob sich dort mikroskopisch sichtbare Plaques gebildet hatten.

Die Plaques, die sich bei der jeweiligen Phagensuspension gebildet hatten, wurden notiert.

### **3.4. Bakteriophagenlysespektrum**

Von den Phagen des Serovars Typhimurium, die mehr als 3 Isolate und von denen des Serovars Enteritidis Phagen, die mindestens 2 Isolate lysieren konnten, wurden 20µl des Phagenlysats an den oberen Rand einer GKZ-Platte getropft und senkrecht nach unten rinnen gelassen. Für eine Minute wurde die Platte bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis die 20µl des Phagenlysates eingezogen waren. Anschließend wurde mit einer sterilen Öse jeweils eine Kolonie vom Bakterienisolat entnommen und in einer senkrechten Linie (zum Verlauf des Phagenlysates) über das Phagenlysats auf der Platte ausgestrichen (Abb. 3). Die Platten wurden bei 30°C für 24h inkubiert. Sollte sich ein Bakterienstamm von der Phage lysieren lassen, konnte dies beim Kreuzungspunkt des Bakteriums und der Phage beobachtet werden. Als Referenz wurde auf jeder Platte eine Kolonie von WT14028 bzw. DSM 17420 als Positivkontrolle aufgetragen. Alle Kreuzungspunkte wurden unter dem Mikroskop genauer betrachtet, um keine Mikroplaques zu übersehen.

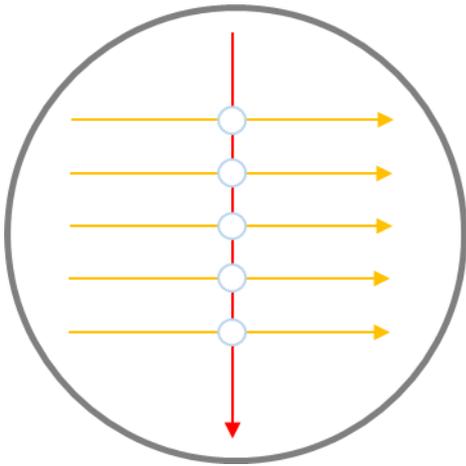


Abb. 3: Das Phagenlysat (roter Pfeil) wurde aufgetropft und nach unten gezogen. Die Bakterien (oranger Pfeil) wurden waagrecht zum Lysat ausgestrichen. In der Mitte wird das Wachstum der Bakterien bei einer positiven Lyse unterbrochen (hellblauer Ring).

## 4. Resultate

### 4.1. Bakteriophagensensibilitätstest

Die Salmonellenphagen konnten keine *Campylobacter*, *Escherichia coli* oder andere der *Enterobacteriaceae* lysieren. Von den *Salmonella* Typhimurium Prophagenlysaten waren einige in der Lage Isolate der Serovare Enteritidis, Heidelberg und Virchow zu lysieren (für das genaue Lysespektrum siehe Tabelle 6). Zusätzlich zu diesen Serovaren waren die Prophagenlysate PS 2, PS 3 und PS L36B in der Lage, die Isolate des Salmonellenserovars Blockley zu lysieren. Die Lysate PS 7, PS 11, PS 24 und PS 44 konnten den Serovar aus der B-Gruppe lysieren. Die Lysate PS 28, PS 45 und PS 46 konnten das Isolat des Serovars Paratyphi lysieren und das Lysat PS 47 lysierte die Isolate der Serovare Paratyphi und der B-Gruppe. Bei den *Salmonella* Enteritidis Prophagen konnte PSE 7 die Isolate des Serovars Virchow und Heidelberg lysieren. PSE 18 konnte die Isolate des Serovars Blockley lysieren und PSE 27D lysierte die Isolate der Serovare Virchow, Paratyphi und Heidelberg. Alle Resultate sind in Tabellen 5 und 6 gelistet. In der Abbildung 4 ist veranschaulicht, wie sich die Ergebnisse auf der Agarplatte darstellten.

Die Phagenlysate PS 2, PS 3, PS 7, PS 11, PS 24, PS 28, PS 44, PS 45, PS 46, PS 47, PS L18B, PS L36B und PSE 7 wurden für den Bakteriophagenlysespektrumtest ausgewählt.





## 4.2. Bakteriophagenlysespektrum

Von den weiter verwendeten Phagen konnte keiner ein Isolat von *Escherichia coli* oder *Yersinia enterocolitica* lysieren. Bei den Salmonellen konnten alle Isolate der Serovare Enteritidis und Heidelberg, bis auf wenige Ausnahmen, von allen getesteten Phagen lysiert werden. Von den Isolaten des Serovars Blockley konnte PS 2 alle, PS L36B alle bis auf eines (FS 77) und PS 3 nur ein Isolat (FS 82) lysieren. Auch PS 7 konnte hier ein Isolat vom Serovar Blockley lysieren. Bei den Isolaten vom Serovar Paratyphi konnten PS 28, PS 45, PS 46 und PS 47 alle und PS L18B kein Isolat lysieren. Die Isolate des Serovars Virchow konnten von nur jeweils einem Phagenlysat lysiert werden. Das Phagenlysat von *Salmonella* Enteritidis konnte in diesem Versuch nur Isolate des Serovars Enteritidis lysieren. Die genauen Ergebnisse sind in der Tabelle 7 aufgelistet. In der Abb. 5 wird das Ergebnis einer Platte veranschaulicht.



Abb. 5: Das Wachstum der Bakterien, die lysiert werden, wird an der Stelle des aufgebrachten Phagenlysates unterbrochen.



## 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden verschiedene aktivierte Salmonellenprophagen auf ihr Infektionsspektrum untersucht. Alle aktivierten Phagen wurden auf verschiedene Salmonellenisolate, Isolate anderer *Enterobacteriaceae* und *Campylobacter coli* und *C. jejuni* getestet, um solche mit einem breiten Wirtsspektrum herauszufiltern. Von den 40 aktivierten *Salmonella* Typhimurium Prophagen konnten zwölf mehr als drei unterschiedliche Isolate infizieren. Bei den vier aktivierten *Salmonella* Enteritidis Prophagen konnten zwei davon mindestens zwei unterschiedliche Isolate lysieren. Diese zwölf Phagen wurden auf weiteren 50 verschiedenen *E.coli*, 50 *Yersinien enterocolitica* und 40 *Salmonellen* unterschiedlicher Serovare getestet. Von allen getesteten Bakterien konnten nur Salmonellen Isolate unterschiedlicher Serovare lysiert werden. Bei den *E.coli* und *Yersinien* wurde kein Isolat von den Phagen lysiert.

In dieser Arbeit konnte nicht gezeigt werden, dass aktivierte Salmonellenprophagen andere Isolate von Salmonellen Serovaren infizieren können. Ob und wie häufig eine Infektion anderer Serovare unter natürlichen Bedingungen ausgelöst werden kann, ist mit diesem Versuch nicht beurteilbar. Studien von MAHMOUDA et al. (2017) und KIM et al. (2018) fanden heraus, dass es Salmonellenphagen möglich ist, *E. coli* zu infizieren. ZHAO et al. (2019) konnten nachweisen, dass sich Salmonellenphagen und Yersinienphagen genetisch ähneln (SCHWUDKE et al., 2007; ZHAO et al., 2019), was eine mögliche Infektion und Transformation nicht ausschließen lässt. In diesen Arbeiten wurde eine Infektion von Yersinien mit Salmonellenphagen nicht durchgeführt. Auch in den von uns durchgeführten Infektionsstudien mit aus Salmonellen aktivierten Prophagen konnten keine *Yersinia enterocolitica* Isolate lysiert werden.

Um zu sehen, warum die aktivierten Prophagen mehrere Isolate unterschiedlicher Salmonellenserovare lysieren konnten, müssten die Phagen mit besonderer Rücksicht auf die Größe des Erbgutes und die Reproduktionsgeschwindigkeit untersucht werden. Kleinere Erbgutgrößen lassen sich schneller replizieren und gehen mit einem kleineren Wirtsspektrum einher, wobei sich langsam replizierende Phagen ein größeres Wirtsspektrum aneignen können (KEEN, 2014). Da es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Proben um keine reinen

Phagenisolate, sondern direkt aus dem Wirt gewonnene aktivierte Prophagenlysate handelte, müsste auch abgeklärt werden, ob sich nur eine oder mehrere verschiedene aktivierte Prophagen im Lysat befinden. Bakterien können verschiedenste Mechanismen aufweisen, um sich vor einer Phagen Infektion zu schützen. Als Beispiel kann bei Salmonellen das PmrA/PmrB-System angeführt werden, welches zu den Resistenzmodifikationsmechanismen gehört. Es ermöglicht den Salmonellen eine Phageninfektionen zu verhindern, ebenso wie es Resistenzen für bestimmte Antibiotika verleiht und das Immunsystem des bakteriellen Wirtes (Mensch, Tier) beeinflusst (HOLGUÍN et al., 2019). Um die Phagenvermehrung verhindern zu können, besitzen Salmonellen im Wesentlichen vier Mechanismen. Die erste Möglichkeit ist die Hemmung der Phagenabsorption (DRULIS-KAWA et al., 2015) über eine Veränderung des Phagenrezeptors. Dieser lässt sich vom Bakterium relativ leicht verändern, während Phagen längere Zeiträume benötigen, um sich einer neuen Mutation im Rezeptor anzupassen (HOLUGÍN et al., 2019). Die zweite Methode ist das Superinfektionsausschlussystem (SIE), welches eine Integration des Erbgutes verhindert. Als drittes sind das Restriktionsmodifikationssystem (RM) und das „clustered regularly interspaced short palindromic repeats“ (CRISPR) System zu nennen. Beide bauen das Phagengenom ab. Der vierte Mechanismus ist das abortive Infektionssystem (ABI), welches die Transkription, Translation und Virusassemblierung der Phagen blockiert (DRULIS-KAWA et al., 2015). Diese Prozesse könnten dafür verantwortlich sein, dass in dieser Studie das *Salmonella* Isolat vom Serovar Virchow F76 ursprünglich von beinahe allen aktivierten Prophagen lysiert werden konnte, im Bakteriophagenlysespektrumtest konnten aber weitere Isolate des Serovars Virchow VS 87 und M21 nur von jeweils einer Phage lysiert werden. VS 87 und M21 sind also sehr resistent gegen eine Infektion von Phagen, wohingegen F76 kaum solche Resistenzen aufweist. Die Resistenzmechanismen können auch der Grund dafür sein, dass in der vorliegenden Untersuchung gewisse *Salmonella* Isolate des Serovars Enteritidis von fast allen aktivierten Prophagenlystaten lysiert werden konnten, aber von bestimmten einzelnen dieser aktivierten Phagen nicht.

Eine andere Studie zeigte, dass Salmonellenprophagen mit einer geringen Wirtsdichte in der Umgebung eine größere Wahrscheinlichkeit haben, ein breiteres Wirtsspektrum zu entwickeln (HUANG et al., 2018).

Bei *Salmonella* sind die bekanntesten Phagenrezeptoren: Flagella-Proteine, OmpC, BtuB, TolC, FhuA, O-Antigen von LPS und Vi-capsular-Antigene. Diese Vielfalt an Wirtsrezeptoren ermöglicht den Phagen einen breiteren Wirtsbereich zu infizieren (CHATURONGAKUL u. OUNJAI, 2014).

Durch den horizontalen Gentransfer können Phagen mittels Transduktion Virulenz- und Resistenzgene übertragen. So konnte in einem Versuch gezeigt werden, dass Phagen das Chloramphenicol-Resistenzgen von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium auf einen Empfängerstamm übertragen konnte (MORENO WEITT et al., 2013). Von den Prophagen Fels-1, Fels-2, Gifsy-1 und Gifsy-2, die bei *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium gefunden wurden, spielen die Gifsy-Prophagen eine wichtige Rolle in der intrazellulären Replikation der Bakterien (NGOI et al., 2018). Die Virulenzgene *sodC1*, *gtgE*, *sopE* und *gtgB* können von Gifsy-2 übertragen werden und wurden in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis und Serovar Typhimurium nachgewiesen (CAPUANO et al., 2013). In anderen Studien konnte *sopE* ebenso in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium und Serovar Enteritidis nachgewiesen werden, aber ebenso im Serovar Virchow (IOANNIDIS et al., 2013) und Serovar Heidelberg (PRAGER et al., 2000). Bei einer Untersuchung von *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolaten konnte die Prophage Gifsy-2 und in einzelnen Fällen auch die Phagen Fels-2 und ST64B isoliert werden (HOFFMANN et al., 2014). Die Phage ST64B ist auch aus dem Serovar Typhimurium bekannt und kodiert für Virulenzfaktoren, die den Typ III Effektorproteinen ähnlich sind. Es gibt auch Phagenfunde die auf eine Koevolution zwischen zwei Arten hindeutet (Hybridphagen). So wurde die Prophage CP4-57 im Serovar Typhimurium gefunden, aber auch in *E. coli* Isolaten (PANG et al., 2013). Die durch Transduktion neu gewonnen Gene können somit die Ausbreitung und Virulenz der Salmonellen fördern. Dieses Wissen sollte bei der Bekämpfung dieses Erregers nicht außeracht gelassen werden.

## 6. Zusammenfassung

Salmonellen zählen zu den wichtigsten bakteriellen Lebensmittelinfektionserregern, die Ausbruchserkrankungen hervorrufen. Das Vorhandensein von Salmonellenprophagen in vielen Salmonellen-Lebensmittelisolaten ist seit der Veröffentlichung von Ganzgenomsequenzdaten bekannt. In wie weit aber aktivierte Prophagen unterschiedlicher Serovare (Typhimurium und Enteritidis) in der Lage sind andere *Salmonella* Serovare, andere *Enterobacteriaceae*, wie *E. coli* und *Yersinia enterocolitica*, oder aber wenig verwandte Bakterien, die sich aber im selben Lebensraum bewegen, wie *Campylobacter coli* und *C. jejuni* zu infizieren, wurden bisher nicht in breiteren Studien untersucht. In dieser Arbeit wurden 40 aktivierte Prophagenlysate von Isolaten des Serovar Typhimurium und 4 des Serovars Enteritidis auf ihr Wirtsspektrum untersucht. Dabei zeigte sich, dass keines dieser aktivierten Prophagenlysate in der Lage war andere *Enterobacteriaceae*, *C. coli* oder *C. jejuni* zu lysieren, aber sehr wohl in der Lage waren andere Salmonellen Serovare zu infizieren. Das Serovar Virchow Isolat ließ sich von 38 aktivierten Prophagenlysaten (35 der Lysate des Serovars Typhimurium und 3 Lysaten des Serovars Enteritidis) infizieren, das Serovar Heidelberg Isolat von 36 (34 der Lysate des Serovars Typhimurium und 2 Lysaten des Serovars Enteritidis), der Serovar Enteritidis DSM 17420, der als Anzuchtmedium für aktivierte Prophagen aus den Serovar Enteritidis Isolaten verwendet wurde, konnte zusätzlich von 28 aktivierten Prophagenlysaten des Serovar Typhimurium infiziert werden. Ein Serovar der B-Gruppe, das nicht weiter differenzierbar war konnte von 6, das Paratyphi sowie das Blockley Isolat konnte von 2 Lysaten infiziert werden. Bei der Überprüfung der ausgewählten Lysate konnten in allen geprüften Isolaten der verschiedenen Serovare sowohl gut als auch schlecht lysierbare Isolate identifiziert werden. Allerdings gab es kein Isolat, das nicht mindestens von einem Lysat infiziert werden konnte.

Die Hypothese, dass aktivierte Prophagen aus Isolaten der Salmonellen Serovare Typhimurium und Enteritidis in der Lage sind verschiedenste Salmonellen Serovare zu infizieren konnte bestätigt werden. Allerdings waren keine der gewonnenen Prophagen Lysate in dieser Studie in der Lage andere *Enterobacteriaceae*, *C. jejuni*, oder *C. coli* zu infizieren.

## 7. Abstract

*Salmonella* are the most important bacterial pathogens causing human food-borne disease outbreaks. Since the publication of whole genome sequencing data, it is known that many *Salmonella* food isolates harbour prophages in their genome. So far it has not been extensively reported if activated prophages from different serovars (Typhimurium und Enteritidis) are able to infect other *Salmonella* serovars, other enterobacteriaceae, like *E. coli* and *Yersinia enterocolitica*, or non-similar bacteria like *Campylobacter coli* and *C. jejuni*, which have similar habitats. In this work 40 activated prophage lysates from *Salmonella* serovar Typhimurium isolates and 3 activated prophage lysates from *Salmonella* serovar Enteritidis were analysed for their extended host spectrum. None of these activated prophage lysates was able to infect any *Enterobacteriaceae*, *C. coli* or *C. jejuni*, but could infect other *Salmonella* serovars. One isolate of serovar Virchow could be infected by 38 activated prophage lysates (35 of serovar Typhimurium and 3 of serovar Enteritidis), an isolate of serovar Heidelberg was able to be lysed by 36 (34 of serovar Typhimurium and 2 of serovar Enteritidis), DSM 17420 serovar Enteritidis, that was used as culture strain for prophage activation of serovar Enteritidis, could be lysed by another 28 lysates of serovar Typhimurium, a non-type-able isolate of the B-group and one Paratyphi isolate could be infected by 6 lysates each and one Blockley isolate could be lysed by 2 activated prophage lysates. All different serovars under study harboured more sensitive and more resistant isolates, but no isolate was tested that could not be infected by at least one of the activated prophages.

The hypotheses, that activated prophages from *Salmonella* serovar Typhimurium and Enteritidis are able to infect various different *Salmonella* serovars could be confirmed. Nevertheless, non of the activated prophage lysates were able to infect any other *enterobacteriaceae*, nor *C. jejuni*, or *C. coli*.

## 8. Literaturverzeichnis

- Al-Shayeb B, Sachdeva F, Chen L, Ward F, Munk P, Devoto A, Castelle C, Olm M, Bouma-Gregson K, Amano Y, He C, Meheust R, Brooks B, Thomas A, Levy A, Matheus-Carnevali P, Sun C, Goltsman D, Borton M, Sharrar A, Jaffe A, Nelson T, Kantor R, Keren T, Lane K, Farag I, Lei S, Finstad K, Amundson R, Anantharaman K, Zhou J, Probst A, Power M, Tringe S, Li W, Wrighton K, Harrison S, Morowitz M, Relman D, Doudna J, Lehours A, Warren L, Cate J, Santini J, Banfield J. 2020. Clades of Huge Phages from across Earth's Ecosystems. *Nature* 578: 425-431.
- Amarillas L, Chaidez C, González-Robles A, León-Félix J. 2016. Complete genome sequence of new bacteriophage phiE142, which causes simultaneously lysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Standards in Genomic Sciences* 11 (89).
- Brüssow H, Canchaya C, Hardt W. 2004. Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: From Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68 (3): 560-602.
- Bai J, Jeon B, Ryu S. 2018. Effective inhibition of *Salmonella* Typhimurium in fresh produce by a phage cocktail targeting multiple host receptors. *Food Microbiology* 77: 52-60.
- Capuano F, Mancusi A, Capparelli R, Esposito S, Proroga Y. 2013. Characterization of Drug Resistance and Virulotypes of *Salmonella* Strains Isolated from Food and Humans. *Foodborne Pathogens and Disease* 10 (11): 963-968.
- Chaturongakul S, Ounjai P. 2014. Phage–host interplay: examples from tailed phages and

- Gram-negative bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* 5 (442).
- Chen Y, Golding I, Sawai S, Guo L, Cox E. 2005. Population Fitness and the Regulation of *Escherichia coli* Genes by Bacterial Viruses. *PLoS Biology* 3 (7): 1276-1282.
- Colavecchio A, Cadieux B, Lo A, Goodridge L. 2017. Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the Enterobacteriaceae Family – A Review. *Frontiers in Microbiology* 8 (1108).
- D'Alessandro B, Escanda V, Balestrazzi L, Iriarte A, Pickard D, Yim L, Chabalgoity J, Betrancor L. 2018. A novel prophage identified in strains from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is a phylogenetic signature of the lineage ST-1974. *Microbial Genomics* 4 (3).
- Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B. 2015. Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches. *Current Medicinal Chemistry* 22: 1757-1773.
- El-Sharkawy H, Tahoun A, El-Gohary A, El-Abasy M, El-Khayat F, Gillespie T, Kitade Y, Hafez H, Neubauer H, El-Adawy H. 2017. Epidemiological, molecular characterization and antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovars isolated from chicken farms in Egypt. *Gut Pathogens* 9 (8).
- EFSA und EDEC (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control). 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 19 (2).
- Fortier L, Sekulovic O. 2013. Importance of Prophages to Evolution and Virulence of Bacterial Pathogens. *Virulence* 4 (5): 354-365.

- Gal-Mor O, Boyle E, Grassl G. 2014. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in Microbiology* 5, 391.
- Gambino M, Sørensen N, Ahern S, Smyrlis G, Gencay Y, Hendrix H, Neve H, Noben J, Lavigne R, Brøndsted L. 2020. Phage S144, A New Polyvalent Phage Infecting *Salmonella* spp. and *Cronobacter sakazakii*. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (15).
- Gyles C, Boerlin, P. 2014. Horizontally Transferred Genetic Elements and Their Role in Pathogenesis of Bacterial Disease. *Veterinary Pathology* 51 (2): 328-340.
- Hoffmann M, Zhao S, Pettengill J, Luo Y, Monday S, Abbott J, Avers S, Cinar H, Muruvanda T, Li C, Allard M, Whichard J, Meng J, Brown E, McDermott P. 2014. Comparative Genomic Analysis and Virulence Differences in Closely Related *Salmonella enterica* Serotype Heidelberg Isolates from Humans, RetailMeats, and Animals. *Genome Biol. Evol.* 6 (5): 1046–1068.
- Holguín A, Cárdenas P, Prada-Peñaranda C, Leite L, Buitrago C, Clavijo V, Oliveira G, Leekitcharoenphon P, Aarestrup F, Vives M. 2019. Host Resistance, Genomics and Population Dynamics in a *Salmonella* Enteritidis and Phage System. *Viruses* 11 (2), 188.
- Huang C, Shi J, Ma W, Li Z, Wang J, Li J, Wang X. 2018. Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices. *Food Research International* 111: 631-641.
- Ioannidis A, Papavasileiou K, Papavasileiou E, Bersimis S, Chatzipanagitou S. 2013. Distribution of Six Effector Protein Virulence Genes Among *Salmonella enterica*

- enterica Serovars Isolated from Children and their Correlation with Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance. Springer International Publishing Switzerland 17: 311–317.
- Islam S, Hu Y, Mizan F, Yan T, Nime I, Zhou Y, Li J. 2020. Characterization of *Salmonella* Phage LPST153 That Effectively Targets Most Prevalent *Salmonella* Serovars. *Microorganisms* 8 (7): 1-18
- Keen E. 2014. Tradeoffs in bacteriophage life histories. *Bacteriophage* 4.
- LaRock D, Chaudhary A, Miller S. 2015. *Salmonellae* interactions with host process. *Nat Rev Microbiol.* 13 (4): 191–205.
- Lin T. 2016. Characterisation data of simple sequence repeats of phages closely related to T7M. *Data in Brief* 8: 828-835.
- Ngoi S, Yap K, Thong K. 2018. Genomic characterization of endemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar I 4,[5],12:i:- isolated in Malaysia. *Genetics and Evolution* 62: 109-121.
- Mahmoud M, Askora A, Barakat A, Rabie O, Hassan S. 2018. Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt. *International Journal of Food Microbiology* 266: 8-13.
- Moreno Switt M, Den Bakker H, Vongkamjan K, Hoelzer K, Warnick L, Cummings K, Wiedmann M. 2013. *Salmonella* Bacteriophage Diversity Reflects Host Diversity on Dairy Farms. *Food Microbiology* 36 (2): 275-285.
- Moreno Switt A, Orsi R, den Bakker H, Vongkamjan K, Altier C, Wiedmann M. 2013. Genomic characterization provides new insight into *Salmonella* phage diversity. *BMC*

- Genomics 14, 481.
- Ochman H, Lawrence J, Groisman E. 2000. Lateral Gene Transfer and the Nature of Bacterial Innovation. *Nature* 405: 299-304.
- Pang S, Octavia S, Feng L, Liu B, Reeves P, Lan R, Wang L. 2013. Genomic diversity and adaptation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from analysis of six genomes of different phage types. *BMC Genomics* 14, 718.
- Peng Q, Yuan Y. 2018. Characterization of a newly isolated phage infecting pathogenic *Escherichia coli* and analysis of its mosaic structural genes. *Scientific Reports* 8 (1): 8086.
- Petsong K, Benjakul S, Chaturongakul S, Moreno Switt A, Vongkamjan K. 2019. Lysis Profiles of *Salmonella* Phages on *Salmonella* Isolates from Various Sources and Efficiency of a Phage Cocktail against *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. *Microorganisms* 7 (4):100
- Pham-Khanh N, Sunahara H, Yamadeya H, Sakai M, Nakayama T, Yamamoto H, Bich V, Miyanaga K, Kamei K. 2019. Isolation, Characterisation and Complete Genome Sequence of a Tequatrovirus Phage, *Escherichia* phage KIT03, Which Simultaneously Infects *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Current Microbiology* 76: 1130-1137.
- Prager R, Miold S, Tietze E, Strutz U, Knuppel B, Rabsch W, Hardt W, Tschäpe H. 2000. Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Int. J. Med. Microbiol* 290: 605-617.
- Ryan M, O'Dwyer J, Adley C. 2017. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. *BioMed Research*

- International, 3782182 (Artikel ID): 1-6.
- Salem M, Pajunen M, Jun J, Skurnik M. 2021. T4-like Bacteriophages Isolated from Pig Stools Infect *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* Using LPS and OmpF as Receptors. *Viruses* 13 (2), 296.
- Sattler, E. 2021. Virulenzgene und deren Vorkommen in Prophagen aus *Salmonella*. Diplomarbeit, Vet. Med. Univ. Wien.
- Schwudke D, Ergin A, Michael K, Volkmar S, Appel B, Knabner D, Konietzny A, Strauch E. 2008. Broad-Host-Range *Yersinia* Phage PY100: Genome Sequence, Proteome Analysis of Virions, and DNA Packaging Strategy. *Journal of Bacteriology* 190 (1): 332-342.
- Shin H, Lee J, Kim H, Choi Y, Heu S, Ryu S. 2012. Receptor Diversity and Host Interaction of Bacteriophages Infecting *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *PloS One* 7 (8).
- Tang F, Zhang P, Zhanga O, Xue F, Ren J, Sun J, Qu Z, Zhuge X, Li D, Wang J, Jiang M, Dai. 2019. Isolation and characterization of a broad-spectrum phage of multiple drug resistant *Salmonella* and its therapeutic utility in mice. *Microbial Pathogenesis* 126: 193-198.
- Torres-Barceló C. 2018. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerging Microbes & Infections*, 7 (1): 1-12.
- Trofeit L. 2021. Prophageninduktion in *Salmonella*, Relevanz für eine Antibiotikaresistenzübertragung. Diplomarbeit, Vet. Med. Univ. Wien.
- Winfield Mollie D, and Groisman Eduardo A. 2003. Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental*

Microbiology, 69 (7): 3687-3694.

Zhao F, Sun H, Zhou X, Liu G, Li M, Wang C, Liu S, Zhuang Y, Tong Y, Ren H. 2019.

Characterization and genome analysis of a novel bacteriophage vB\_SpuP\_Spp16 that infects *Salmonella enterica* serovar Pullorum. Virus Genes 55: 532-540.

## 9. Anhang

Tabelle 4: Bakterien für Bakteriophagensensitivitätstest

<b>Name</b>	<b>Bakterienart</b>	<b>Serotyp</b>	<b>Herkunft</b>
<b>NCTC 12662</b>	<i>Campylobacter jejuni</i>		DSMZ
<b>NCTC 11168</b>	<i>Campylobacter jejuni</i>		DSMZ
<b>C 81-176</b>	<i>Campylobacter jejuni</i>		
<b>DSM 122420</b>	<i>Escherichia coli</i>		DSMZ
<b>WT 14028</b>	<i>Salmonella</i>	Typhimurium	ATCC
<b>DSM 17420</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	DSMZ
<b>F22</b>	<i>Salmonella</i>	Blockley	*
<b>F27A</b>	<i>Salmonella</i>	Heidelberg	*
<b>F29</b>	<i>Salmonella</i>	Paratyphi	*
<b>FS 47</b>	<i>Salmonella</i>	Typhimurium geißellos	*
<b>FS 76</b>	<i>Salmonella</i>	Virchow	*
<b>WS 84</b>	<i>Salmonella</i>	Hadar	*
<b>M 63</b>	<i>Salmonella</i>	Rissen	*
<b>M 67</b>	<i>Salmonella</i>	Kentucky	*
<b>M 98</b>	<i>Salmonella</i>	B - Gruppe	*

<b>ATCC 13883</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		ATCC
<b>ATCC 8090</b>	<i>Citrobacter freundii</i>		ATCC
	<i>Erwinia herbicola</i>		ATCC
	<i>Proteus mirabilis</i>		ATCC
	<i>Proteus vulgaris</i>		ATCC
	<i>Serratia marcescens</i>		ATCC

\*Stammsammlung der Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Tabelle 5: Aktivierte *Salmonella* Typhimurium Prophagen

<b>Name</b>	<b>Name</b>	<b>Name</b>	<b>Name</b>
PS 1	PS 14	PS 25	PS 37
PS 2	PS 15	PS 26	PS 38
PS 3	PS 16	PS 27	PS 43
PS 4	PS 17	PS 28	PS 44
PS 5	PS 19	PS 30	PS 45
PS 7	PS 20	PS 31	PS 46
PS 8	PS 21	PS 32	PS 47
PS 9	PS 22	PS 33	PS L18B
PS 11	PS 23	PS 35	PS L36B
PS 13	PS 24	PS 36	PS S157

Tabelle 6: Aktivierte *Salmonella* Enteritidis Prophagen

**Name**

PSE 7

PSE 18

PSE 27D

PSE US30B

Tabelle 7: Bakterien für Bakteriophagenlysespektrum

<b>Name</b>	<b>Bakterienart</b>	<b>Serotyp</b>	<b>Herkunft</b>
<b>E 3</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 4</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 9s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 10s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 11sa</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 11sb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 12sa</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 12sb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 13s</b>	<i>Escherichia coli</i>	E 13s	*
<b>E 14s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 15s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 18sa</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 18sb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 19s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 21s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 22sa</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 22sb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 23s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 24s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 25s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 26sa</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 26sb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 27s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 28sa</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 28sb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 30sa</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 30sb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 31sa</b>	<i>Escherichia coli</i>		*

<b>E 31sb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 32s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 33sa</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 33sb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 34s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 35sa</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 35sb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 36s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 37s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 38sa</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 38sb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 40s</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 1Ma</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 1Mb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 2M</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 3M</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 4M</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 5Ma</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 5Mb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 6Mb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 7M</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>E 15Mb</b>	<i>Escherichia coli</i>		*
<b>2011 06</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2011 07</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2011 38</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2011 39</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2011 129</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2011 137</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2012 15</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2012 16</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*

<b>2012 58</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2012 134</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2012 138</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2013 71</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2013 117</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2013 128</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2013 132</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2013 185</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2014 12</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2014 41</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2014 77</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2014 79</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2014 94</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2015 7</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2015 14</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2015 15</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2015 131</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2015 134</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2016 16</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2016 48</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2016 111</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>2016 153</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 9s</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y18s 1kl.</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 22s-c</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 36M-a</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 17M-a</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 32M-a</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 28M-a</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 10s-a</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*

<b>Y 13s-a</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 18s1 9<sup>8</sup></b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 36M-b</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 17M-b</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 3M-b</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 28M-a</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 10s-b</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 13s-a</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 18s-a*</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 22M-a</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 36M-c</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>Y 23M-a</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		*
<b>FS 4A</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 4</b>	<i>Salmonella</i>		*
<b>FS 5</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 10</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 15</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 19</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 27B</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 30</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 34</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 51</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 52</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 55</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 56</b>	<i>Salmonella</i>	Blockley	*
<b>FS 60</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 63</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 64</b>	<i>Salmonella</i>	Blockley	*
<b>FS 69</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 77</b>	<i>Salmonella</i>	Blockley	*

<b>FS 78</b>	<i>Salmonella</i>	Heidelberg	*
<b>FS 80</b>	<i>Salmonella</i>	Blockley	*
<b>FS 82</b>	<i>Salmonella</i>	Blockley	*
<b>FS 83</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>FS 88</b>	<i>Salmonella</i>	Blockley	*
<b>FS 91</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>WS 27A</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>WS 27D</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>WS 30A</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>WS 30B</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>WS 43</b>	<i>Salmonella</i>	Paratyphi	*
<b>WS 47</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>WS 60</b>	<i>Salmonella</i>	Paratyphi	*
<b>WS 75</b>	<i>Salmonella</i>		*
<b>WS 77A</b>	<i>Salmonella</i>	Heidelberg	*
<b>VS 87</b>	<i>Salmonella</i>	Virchow	*
<b>M 21</b>	<i>Salmonella</i>	Virchow	*
<b>S 7</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>S 18</b>	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	*
<b>S 157</b>	<i>Salmonella</i>	Typhimurium	*
<b>S 187</b>	<i>Salmonella</i>	Heidelberg	*

\*Stammsammlung der Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln der Veterinärmedizinischen Universität Wien

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnis Bakteriophagensensibilitätstest von <i>Salmonella</i> Enteritidis Prophagen. ....	21
Tabelle 2: Ergebnisse Bakteriophagensensibilitätstest von <i>Salmonella</i> Typhimurium aktivierten Prophagen. P = lysiert; - = nicht lysiert.....	22
Tabelle 3: Bakteriophagenlysespektrum bei <i>Salmonellen</i> . P = lysiert; - = nicht lysiert.....	24
Tabelle 4: Bakterien für Bakteriophagensensitivitätstest.....	36
Tabelle 5: Aktivierte <i>Salmonella</i> Typhimurium Prophagen .....	37
Tabelle 6: Aktivierte <i>Salmonella</i> Enteritidis Prophagen.....	37
Tabelle 7: Bakterien für Bakteriophagenlysespektrum .....	38

## 11. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.....	7
Abb. 2.....	11
Abb. 3.....	19
Abb. 4.....	21
Abb. 5.....	23

## 12. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ABI	abortive Infektionssystem
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E. coli	Escherichia coli

Fa.	Firma
GKZ	Gesamtkeimzahl
h	Stunde
LB	lysogenic broth
LPS	Lipopolysaccharide
M	Mol
MGE	mobile genetische Einheit
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MH	Müller Hinton
min	Minute
ml	Milliliter
NTS	nicht typhoidale Salmonellen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFU/ml	plaque forming units per millilitre
RM	Resistenzmodifikationsmechanismus
rpm	rounds per minute
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
SIE	Superinfektionsausschlussystem
ssLB	semi solid lysogenic broth
ssLBA	semi solid lysogenic broth Agar
Tab.	Tabelle
WHR	wide host range

