

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin

Der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches
Gesundheitswesen in
der Veterinärmedizin

(Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Martin Wagner, Dipl. ECVPH)

Die metabolische Auswirkung aktivierter Prophagen in *Salmonella*

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von

Charlotte Gödl

Wien, im Mai 2022

Betreuerin:

Ao.Univ.-Prof. Dr. med. vet. Friederike Hilbert, Dipl. ECVPH

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches
Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachter:

Ao.Univ.-Prof. Dr. med. vet. Peter Paulsen, Dipl. ECVPH

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches
Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

Veterinärmedizinische Universität Wien

Danksagung:

Als erstes bedanke ich mich bei meiner Betreuerin, Ao. Univ.-Prof. Dr. med. vet. Friederike Hilbert: ein herzliches Dankeschön für die Bereitstellung des Diplomarbeitsthemas, für die tatkräftige Unterstützung, sämtliches Korrekturlesen und Beantworten von allen kleinen und großen Fragen.

Ein besonders großes Danke möchte ich auch an Dr. Dimitrij Sofka richten: für seine großartige Unterstützung im Labor und das unermüdliche Erklären und Diskutieren auftauchender Fragen.

Ebenfalls möchte ich sämtlichen Freunden Danke sagen, ganz besonders Kathi Weber und Birgit Kleedorfer, die mich mit Korrekturlesen unterstützt haben, bei Fragen und Unsicherheiten zum Thema Diplomarbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind und aufmunternde Worte gefunden haben - DANKE!!!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1 Bakteriophagen	3
2.1.1 Beiträge der Bakteriophagen zur Pathogenität ihrer Wirte	5
2.1.2 Bakteriophageneinfluss auf den Wirtsmetabolismus	8
2.1.3 Bakteriophagen-Einsatz im Lebensmittelbereich.....	11
2.2 Salmonellen	13
2.2.1 Virulenz und Pathogenität bei Salmonellen	14
2.2.2 Salmonellaphagen und -prophagen und ihr Beitrag zur Pathogenität.....	16
2.2.3 Nachweis und Differenzierung von Salmonellen.....	18
2.2.4 Biochemische Eigenschaften der Salmonellen	21
2.2.5 Salmonellen mit atypischen biochemischen Eigenschaften.....	25
3. Material und Methode	28
3.1 Material.....	28
3.1.1 Probenmaterial	28
3.1.2 Testsysteme	28
3.1.3 Geräte und sonstige Materialien.....	30
3.1.4 Nährmedien	31
3.2 Methode	32
3.2.1 Herstellung einer Flüssigkultur	32
3.2.2 Inokulation der Kultur mit lysogenen Phagen.....	32
3.2.3 Pelletgewinnung	32
3.2.4 Beimpfung der EnteroPluri-Tests	33
3.2.5 Auswertung der Testergebnisse	33
3.2.6 Überprüfung der Testergebnisse	34
3.2.6.1 Überprüfung der Verwertung von Citrat als einziger Kohlenstoffquelle	35
3.2.6.2 Überprüfung der Urease-Aktivität.....	36
3.2.6.3 Überprüfung der Lysindecaboxylase-Aktivität.....	37
4. Ergebnisse.....	39
4.1 Bestimmung des Phagentiters	39

4.2 Ergebnisse der EnteroPluri-Tests.....	39
4.3 Ergebnisse der Überprüfung abweichender Testergebnisse	47
4.3.1 Ergebnisse der Harnstoffhydrolyse auf Harnstoff-Agar nach Christensen.....	47
4.3.2 Ergebnisse der Citratverwertung auf Simmons-Citrat-Agar	48
4.3.3 Ergebnisse der Lysindecarboxylierung auf Lysin-Decarboxylase-Agar	49
5. Diskussion	50
6. Zusammenfassung	58
6.1 Abstract.....	59
7. Abkürzungsverzeichnis	60
8. Literaturverzeichnis	62
9. Abbildungsverzeichnis	72
10. Tabellenverzeichnis	73

1. Einleitung und Fragestellung

Ein vieldiskutiertes Thema in den letzten Jahren ist der Einsatz von Bakteriophagen, Viren, die spezifisch nur Bakterien befallen, als Antibiotikaersatz in Klinik- und Lebensmittelbereich, da aufgrund steigender Antibiotikaresistenzen nach Alternativen gesucht wird. Während Bakteriophagen in einigen Nicht-EU-Ländern bereits zum Einsatz kommen, ist die EU vorsichtiger und zurückhaltend in ihren Empfehlungen, hier fehlen vor allem evidenzbasierte Studien nach westlichen Maßstäben im Zusammenhang mit Wirkung und Sicherheit (Wienhold et al. 2019). Die rein lytischen Phagen, die zum Einsatz kommen sollen, gelten zwar als ungefährlich, jedoch gibt es auch Vorbehalte, etwa hinsichtlich ihres Potentials, unerwünschte Merkmale wie Antibiotikaresistenzen und pathogene Eigenschaften zu übertragen (Garcia et al. 2008).

Grundsätzlich kann man Bakteriophagen nach dem Zustand unterscheiden, in dem sie vorkommen. Dabei können lytische (virulente) Bakteriophagen, die ihr Zielbakterium auflösen und somit unschädlich machen, von lysogenen (temperenten) Phagen unterschieden werden (Fuchs et al. 2014). Lysogene Phagen können zur Evolution der Bakterien beitragen, indem sie ihre DNA ins Wirtsgenom einbauen (es entsteht ein Prophage), wodurch sie ihrem Wirt neue Eigenschaften verleihen und sein Verhalten vielfältig beeinflussen können (Wahl et al. 2019). So können sie für verschiedene Fitnessfaktoren kodieren oder die Wirkungsweise des bakteriellen Gens, in das sie integriert sind, verändern (Brüssow et al. 2004). Auch komplexere Einflussnahme ist möglich, wie etwa bei der aktiven Lysogenie, bei der der Phage bestimmt, wann das Gen, in das er integriert ist, exprimiert wird (Feiner et al. 2015).

Während die Beiträge der Bakteriophagen zur Pathogenität von Bakterien (z. B.: phagenkodierte Virulenzfaktoren) bereits gut untersucht sind, gibt es über ihre Auswirkungen auf die Stoffwechselleistungen des Wirtsbakteriums weniger Arbeiten (Wahl et al. 2019). Bekannt ist, dass lytische Phagen den Wirtsstoffwechsel für eine erfolgreiche Phagenproduktion adaptieren und reprogrammieren (Roucourt und Lavigne 2009).

Bei temperenten Phagen scheint der Einfluss auf den Stoffwechsel je nach Bakteriophage und Wirt unterschiedlich zu sein: während sich bei *Desulfovibrio*-Arten die Entfernung seiner

Prophagen aus dem Genom auf den Stoffwechsel auswirkte (Balarjishvili et al. 2021), ließen sich bei *Corynebacterium glutamicum* nach Entfernung von dessen Prophagen aus dem Genom keine signifikanten Unterschiede feststellen (Baumgart et al. 2013).

Dabei spielt der Metabolismus auch für die Pathogenese von Bakterien eine wichtige Rolle: So erlauben Virulenzfaktoren wie Typ-III-Sekretionssystem und Effektorproteine bei *Salmonella* Typhimurium zwar den Eintritt in den intrazellulären Raum (Gerlach und Hensel 2007), für Wachstum und Überleben ist allerdings eine Anpassung des Stoffwechsels an die geänderten Umgebungsbedingungen, wie verfügbare Nährstoffe, von entscheidender Bedeutung (Taylor und Winter 2020).

Bei *Salmonella enterica*, einem der häufigsten lebensmittelübertragenen Krankheitserreger weltweit, handelt es sich um ein sehr anpassungsfähiges Bakterium, das dazu noch eine große Diversität aufweist, mit über 2500 Serovaren, die wiederum etliche Stämme beinhalten (Selbitz et al. 2015). Dazu finden sich immer wieder Isolate unterschiedlicher *Salmonella*-Stämme mit atypischen biochemischen Eigenschaften, bei denen oftmals der Verdacht besteht, dass sie im Zuge einer Anpassung an veränderte Umgebungsbedingungen entstanden sind (McDonough et al. 2000, Mourao et al. 2020, Sakano et al. 2013). Woher diese veränderten Eigenschaften kommen, ist nicht immer bekannt. Allgemein können Bakterien ihre Eigenschaften auf verschiedenen Wegen verändern. Neben Mutationen spielen Genübertragungen durch Transformation, Konjugation und Transduktion, die Weitergabe von genetischem Material durch Bakteriophagen, eine Rolle (Fuchs et al. 2014).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit soll untersucht werden, ob sich eine Prophageninfektion direkt auf die biochemischen Eigenschaften von Salmonellen auswirken kann. Die Arbeitshypothese lautet: Eine Phageninfektion hat Auswirkungen auf den Stoffwechsel von *Salmonella* Typhimurium. Zu diesem Zweck wird ein *Salmonella* Typhimurium Stamm mit temperenten Phagen infiziert. Im Anschluss daran werden seine biochemischen Eigenschaften mithilfe eines Multitestsystems (Enteropluri-Test) überprüft.

2. Literaturübersicht

2.1 Bakteriophagen

Bekannt sind Bakteriophagen bereits seit Beginn des 20. Jahrhunderts, erste Arbeiten leisteten hier vor allem d'Herelle und Twort. Während die westliche Welt im Zuge der Antibiotika-Entwicklung in den 40ern das Interesse an ihnen verlor, waren sie in anderen Ländern weiterhin in Gebrauch (Fuchs et al. 2014). Mit zunehmenden Resistenzen gegen Antibiotika gewannen sie wieder an Interesse. Während sie in Ländern wie Georgien, in Osteuropa und Russland routinemäßig sowohl therapeutisch als auch im Lebensmittelbereich zum Einsatz kommen, sind EU-Länder hier zurückhaltender, fehlen doch vor allem evidenzbasierte Studien zu ihrer Sicherheit nach westlichen Maßstäben (Garcia et al. 2008, Vikram et al. 2021, Wienhold et al. 2019).

Bei Bakteriophagen (kurz: Phagen) handelt es sich um Viren, die spezifisch nur Bakterien befallen. Sie kommen ubiquitär vor und sind weltweit verbreitet. Ihr Erregerspektrum ist dabei oft sehr spezifisch. So befallen die meisten Phagen nur eine Spezies von Bakterien, manche auch nur einzelne Stämme. Bei den Phagen kann man verschiedene Grundformen unterscheiden. Es gibt fadenförmige, kugelförmige oder auch ganz einfach aufgebaute, die nur aus einer Proteinhülle bestehen, die das Erbgut enthält. Die meisten beschriebenen Phagen (ungefähr 96 %) lassen sich allerdings der Gruppe der Kopf-Schwanz-Phagen (*Caudovirales*) zuordnen. Diese lässt sich wiederum je nach Aufbau des Schwanzes in drei Familien unterteilen: die *Myoviridae* mit langen, kontraktilen Schwänzen, die *Siphoviridae* mit langen, nicht kontraktilen Schwänzen und den *Podoviridae* mit kurzen, nicht kontraktilen Schwänzen. Die *Caudovirales* folgen alle einem allgemeinen Bauprinzip: Man findet einen Kopfteil aus Kapsid und Nukleinsäuren, der somit das Genom enthält (bei den Kopf-Schwanz-Phagen meist doppelsträngige DNA, es gibt aber auch RNA-Phagen), und einen Schwanz mit Grundplatte und Einspritzapparat (ein dünnes Rohr, durch das die Phagen-DNA in die Wirtszelle injiziert wird). Verbunden sind die zwei Teile über einen Kragen. Am Schwanz finden sich verschiedene komplizierte Schwanzanhänge wie Fibrillen und Spikes, die die

Anheftung an der Wirtszelle ermöglichen (Fokine und Rossmann 2014, Fuchs et al. 2014, Selbitz et al. 2015).

Grundsätzlich kann man zwischen zwei Arten von Phagen unterscheiden, benannt nach dem Lebensweg, den sie einschlagen: die lytischen (virulenten) und die temperenten (lysogenen) Phagen. Dabei gehen lytische Phagen unmittelbar nach Infektion in den Produktionszyklus über und lysieren ihr Zielbakterium. Temperente Phagen hingegen können zwischen lytischem und lysogenem Zyklus wechseln. Da es sich bei Phagen um Viren handelt, haben sie keinen eigenen Stoffwechsel und sind zur Vermehrung auf Wirtszellen angewiesen. Bei beiden Phagenarten beginnt der Lebensweg mit der Anheftung (Adsorption) an die Wirtszelle: hierbei erkennt der Phage sein Bakterium und heftet sich an Rezeptoren an dessen Oberfläche. Es folgt die Injektion und Infektion: der Phage formt eine Öffnung in die äußere Zellmembran und injiziert über den Einspritzapparat die Phagen-DNA (RNA) in die Wirtszelle. Der Rest des Phagen verbleibt an der Außenseite als leere Hülle. Handelt es sich um einen lytischen Phagen, so setzt sofort der Produktionszyklus ein. Der Stoffwechsel der Wirtszelle wird adaptiert, es folgen die Transkription des Virusgenoms, die Translation der viralen Proteine und schließlich die Replikation der viralen DNA. Die neu gebildeten Phagengenome werden mit den gebildeten Proteinen zu fertigen Phagen zusammengebaut, im Bakterium werden immer mehr Phagen gebildet bis es zur Lyse des Bakteriums kommt. Die Phagen werden frei und infizieren neue Bakterien (dabei kann es zum horizontalen Gentransfer kommen). Handelt es sich jedoch um temperente Phagen, so wird nach Infektion ihre virale DNA ins Bakteriengenom eingebaut (es entsteht ein Prophage) und an die Tochterzellen bei Teilung der Bakterienzelle mit weitergegeben (vertikaler Gentransfer). Der Phage befindet sich dabei in einem latenten Zustand, in dem es weder zum Zelltod seines Wirtsbakteriums kommt, noch Phagenpartikel produziert werden. Über Repressorproteine (die vom Phagengenom kodiert werden) wird der Übergang in den lytischen Zustand unterdrückt. Kommt es allerdings zu Stressreizen, wird der Repressor inaktiviert, der Phage wechselt vom lysogenen in den lytischen Zustand (Induktion). Der Produktionszyklus beginnt mit den bereits beschriebenen Schritten, die zur Lyse der Wirtszelle führen. Ein Prophage kann spontan, durch äußere Stressreize oder durch diverse DNA-schädigende Noxen (z. B.: chemisch: Mitomycin C,

physikalisch: UV-Strahlung) induziert werden (Feiner et al. 2015, Fuchs et al. 2014, Kropinski et al. 2007, Selbitz et al. 2015).

Ein weiterer Zustand, in dem sich der Phage befinden kann, ist die Pseudolysogenie. Hierbei handelt es sich um eine instabile Situation, die unter schlechten Nährstoffbedingungen auftreten kann. Das Phagengenom wird dabei nicht ins Wirtsgenom eingebaut, sondern liegt in der Zelle als Episom vor, als Preprophage. Bessert sich die Nährstoffsituation, tritt der Phage entweder in das lytische oder lysogene Stadium ein (Feiner et al. 2015).

2.1.1 Beiträge der Bakteriophagen zur Pathogenität ihrer Wirte

Während lytische Phagen ihre Wirtszelle lysieren (auflösen), und somit ihre Bakterienzelle unschädlich machen, können lysogene Phagen die Pathogenität ihres Wirts steigern. Pathogenität und Virulenz von Bakterien hängen dabei von verschiedenen Pathogenitätsfaktoren ab, die entlang des ganzen Infektionsweges eine Rolle spielen. Dazu gehören Adhäsine, Invasine, Exotoxine oder Schutzfaktoren vor dem Immunsystem. Viele von ihnen können phagenkodiert sein (Wagner und Waldor 2002, Tinsley et al. 2006). Beispiele wären die antiphagozytischen Determinanten in Streptokokken (Spanier und Cleary 1980), das Shiga-Toxin bei *Escherichia coli* (Berger et al. 2019) oder Superoxiddismutasen bei *Salmonella enterica* (Brüssow et al. 2004). Die Virulenz kann aber auch gesteigert werden, indem der Phage für Regulationsfaktoren kodiert, die die Expression von bakteriellen Virulenzgenen steigert, oder er für Enzyme kodiert, die bakterielle Komponenten ändern, die das Bakterium virulenter machen. Phagenpartikel selbst können auch direkt pathogen wirken (Wagner und Waldor 2002, Tinsley et al. 2006).

Dazu kommt, dass Phagen ihrem Wirt noch andere Vorteile verleihen können: sie werden gemeinsam mit den Virulenzfaktoren als Fitnessfaktoren bezeichnet. Schon die Integration eines Prophagen selbst bringt seinem Wirt einen Vorteil, da sie ihn vor der Infektion mit anderen Phagen schützt (Brüssow et al. 2004).

Zu erwähnen ist aber, dass temperente Phagen auch die gegenteilige Wirkung entfalten und die Virulenz senken können, wie ein Versuch an *Bordetella bronchiseptica* zeigt: ein temperenter Phage unterbrach dabei das *pilin*-Gen, das für das Pilin-Protein kodiert, welches erst die Adhäsion des Bakteriums an Epithelzellen ermöglicht (Chen et al. 2020).

Wenn Prophagen den Phänotyp oder die Fitness ihres Wirts ändern, spricht man von lysogener Konversion. Lysogene Konversion findet man, wenn die phagenkodierten Gene eine bakterielle Funktion ausüben, wie zum Beispiel beim Scharlachtoxin. Alle Extragene im Phagengenom, die keine Phagenfunktion haben, aber als Fitnessfaktor für den Wirt wirken, werden als lysogene Konversionsgene oder auch Morons bezeichnet. Es gibt auch die negative lysogene Konversion. Sie liegt dann vor, wenn der eingebaute Phage ein funktionelles bakterielles Gen unterbricht und es somit funktionslos macht (Brüssow et al. 2004, Feiner et al. 2015).

Den Vorgang, bei dem genetisches Material von einer Bakterienzelle auf eine andere durch einen Phagen übertragen wird, nennt man Transduktion. Sie spielt bei der Weitergabe genetischer Information eine wichtige Rolle und kann zur Entstehung virulenter Stämme beitragen, wie durch den Transfer von Toxingenen. Transduktion kommt dadurch zustande, dass bei Phagenreplikation auch Teile vom Wirtsgenom herausgeschnitten und bei Neuinfektion weitergegeben werden. Die Übertragung kann dabei spezifisch (beim Übergang in den lytischen Zyklus werden dem Prophagen benachbarte bakterielle DNA-Abschnitte mitvermehrt) oder unspezifisch (auch als generelle Transduktion bezeichnet: sie geschieht zufällig, dabei werden Bruchstücke der bakteriellen DNA in der Phagenhülle mitgenommen) erfolgen. Die Weitergabe kann horizontal erfolgen, durch freiwerdendes Material bei Lyse des Bakteriums, oder vertikal von Mutterzelle auf Tochterzellen durch den Prophagen im bakteriellen Chromosom (Fuchs et al. 2014, Kropinski et al. 2007, Selbitz et al. 2015). Auch die Weitergabe von Antibiotikaresistenzen über Antibiotikaresistenzgene kann phagenvermittelt sein (Shousha et al. 2015).

Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass Prophagen das Verhalten ihrer Wirtszelle auch komplexer beeinflussen können: Vermutet wird ein Phagen-Regulationssystem, in dem der Prophage auf Umweltreize aus der Umgebung, von den Nachbarzellen, geänderten

Nährstoffbedingungen und vieles mehr reagiert und seine Wirtszelle, oder auch den bakteriellen Zellverband zu seinem Vorteil steuert, Anpassungen vornimmt und weitergibt, als mutualistischer Symbiont, der zu einem evolutionsgenetischen Vorteil gegenüber anderen Bakterien führt (Argov et al. 2017, Feiner et al. 2015).

Feiner ergänzt diese Auffassung durch den Begriff der aktiven Lysogenie (Feiner et al. 2015): wird der temperente Phage in ein funktionelles bakterielles Gen eingebaut, funktioniert der Prophage als aktiver Regulator für seine Wirtszelle, der bestimmt, wann das unterbrochene Gen exprimiert wird: Ein Beispiel hierfür ist *Listeria monocytogenes*, ein intrazellulärer Erreger, der im Zytosol seiner Zielzelle lebt. Um das zu können, ist es essentiell, dass er den Phagosomen entkommt. Die effektive Flucht wird über das *comK*-Gen ermöglicht, das einen Prophagen beinhaltet. Solange der Prophage darin liegt, ist es inaktiv, löst er sich allerdings daraus, wird es funktionell. Nach erfolgreicher Flucht wird der Prophage reintegriert, es kommt zu keiner Lyse (Pasechnik et al. 2020). Dieses Verhalten legt einen phagenvermittelten regulatorischen Wechsel in der bakteriellen Genexpression nahe. *L. monocytogenes* wäre ein Beispiel für reversible aktive Lysogenie, nicht reversible aktive Lysogenie liegt dann vor, wenn der Prophage nicht wieder reintegriert wird (Feiner et al. 2015). Für Salmonellen sind (noch) keine Beispiele für aktive Lysogenie beschrieben (Wahl et al. 2019).

Wie die Interaktion Phage-Wirtszelle-Umgebung genau funktioniert ist nicht bekannt. Vermutungen legen eine Verknüpfung mit dem bakteriellen Quorum-sensing-System nahe, da es bei verschiedenen Prozessen, an denen Prophagen beteiligt sind, ebenfalls involviert ist (Hargraeves et al. 2014). Auch wenn noch unsicher ist, woher der Phage seine Informationen bekommt, so liegen doch bereits Beispiele vor, die phagenvermittelte Regulation vermuten lassen (Argov et al. 2017). Eines wäre *Pseudomonas aeruginosa*, ein Bakterium, das im Verlauf schwerer Atemwegsinfektionen, die zur zystischen Fibrose führen, eine schnelle Adaption an geänderte Bedingungen vornehmen muss: dazu gehören Verlust der Motilität (Biofilmbildung) und Quorum sensing, geänderter Stoffwechsel und Resistenz zu Antibiotika. Hier helfen temperente Phagen, die diese Adaption erleichtern bzw. ermöglichen (Davies et al. 2016).

Bei *Streptococcus pyogenes* steigert ein nicht-infektiöser Prophagenrest (SpyCIM1), der im Operon des DNA-Mismatch/Repair-Systems (MMR) liegt, die Mutationsraten: Unter günstigen Bedingungen (exponentielle Phase) wird er herausgeschnitten, und hinterlässt ein funktionsfähiges MMR-System. Verschlechtern sich die Bedingungen (stationäre Phase), wird er reintegriert und die Mutationsrate steigt aufs 100fache, und damit auch die Möglichkeit, dass fürs Überleben brauchbare Mutationen auftreten (Scott et al. 2008).

Auch im Überleben von *Bacillus anthracis* scheinen Phagen eine übergeordnete Rolle zu spielen: Schuch und Fischetti (2009) zeigten, dass lysogene Phagen die Sporulation verhindern oder fördern konnten und phagenkodierte Faktoren zu geänderten Phänotypen führten, was wiederum geänderte Überlebensfähigkeiten nach sich zog und ein Überleben in unterschiedlicher Umgebung ermöglichte, sowohl im Erdboden als auch im Darm von Erdwürmern (Schuch und Fischetti 2009).

Mittlerweile sind schon verschiedene Beiträge von Phagen zum Wirtszellverhalten bekannt, gleichzeitig sind noch viele Wege unerforscht. Da fast jedes Bakterium Prophagen beinhaltet und Phagen fast überall vorkommen, kann davon ausgegangen werden, dass sich noch mehr bakterielle Eigenschaften auf die Interaktion mit Phagen zurückführen lassen (Hargreaves et al. 2014).

2.1.2 Bakteriophageneinfluss auf den Wirtsmetabolismus

Da es sich bei Bakteriophagen um Viren handelt, besitzen sie keinen eigenen Stoffwechsel und sind somit auf ihre Wirtszelle angewiesen. Phagen-Wirtsinteraktionen beginnen gleich mit der Infektion der Wirtszelle. Der Phage muss vor der Abwehr des Wirts geschützt und der Stoffwechsel der Wirtszelle für die Phagenproduktion adaptiert werden, wobei im lytischen Zyklus die Produktion immer neuer Phagen bis hin zur Lyse der Wirtszelle im Vordergrund steht. Dabei werden Wirtsproteine unterdrückt, aktiviert und funktionell umgeleitet (Roucourt und Lavigne 2009). Hierfür können Viren Hilfgene enthalten (auxiliary genes), die vom Wirtsgenom übernommen werden und metabolische Funktionen haben. Durch Analysen metagenomischer Daten von Global Ocean Survey-(GOS-)Datensätzen konnten gesteigerte

auxiliary genes und ihnen zugeordnete Stoffwechselwege identifiziert werden. Dabei waren viral verstärkte Wege vor allem dem Purin- und Pyrimidinstoffwechsel zuzuordnen oder Stoffwechselwegen, die diesen direkt oder indirekt beeinflussen (Enav et al. 2014). Einer dieser beeinflussenden Stoffwechselwege ist der Pentose-Phosphat-Weg. Der große Einfluss, der von Phagen ausgeübt werden kann, konnte bei diesem Weg anhand von Cyanophagen gezeigt werden. Cyanophagen besitzen Gene, die in der Infektion von Cyanobakterien für Proteine kodieren, die die Photosynthese steigern und gleichzeitig ein Inhibitor-Protein, CP12, das den wirtseigenen Kohlenstoffstoffwechsel im Calvinzyklus blockiert und so den Kohlenstoff direkt in den Pentose-Phosphat-Weg umleitet, für den sie ebenfalls Gene tragen. Durch diese Reaktionen wird die NADPH-Rate verdoppelt und somit auch die nutzbare Energie für die Phagenproduktion (Thompson et al. 2011).

Bei einer Studie an *Pseudomonas aeruginosa* während der Infektion mit sechs verschiedenen lytischen Phagen wurden Veränderungen im Stoffwechsel anhand intrazellulärer Metabolite betrachtet. Hier zeigte sich, dass es einen deutlichen Unterschied bei den intrazellulären Metaboliten zwischen phagen-infizierten Zellen und nicht phagen-infizierten Zellen gibt, dass es aber zu keiner universellen Phagen-Antwort kommt (mit Ausnahme der Pyrimidinsynthese, diese war gesteigert). Dafür gab es viele Änderungen, die sich je nach Phage und Infektionszeitpunkt unterschieden. Erwartet wurde eine Verstärkung von Stoffwechselwegen, die auf den *AMGs*, *Auxiliary metabolic genes* (Gene von Viren, deren Produkte in verschiedene essentielle Schritte im Wirtsstoffwechsel eingreifen), festgelegt sind. Diese wurden, wie erwartet, deutlich verstärkt, allerdings konnte ihnen ein Großteil der Veränderungen in den Metaboliten nicht zugeordnet werden. Die meisten Veränderungen traten bereits früh in der Infektion auf (De Smet et al. 2016). In der frühen Phase der Phageninfektion ist das Auftreten vieler kleiner Peptide und Proteine beschrieben. Während ihre Funktion oft noch unbekannt ist, können ihre korrespondierenden Gene gelöscht werden, ohne dass es zu einem Einfluss auf die Phagenproduktion kommt (unter Laborbedingungen). Es besteht der Verdacht, dass sie nur unter bestimmten Umgebungsbedingungen oder bei der Infektion bestimmter Wirte eine Rolle spielen. Es ist auch möglich, dass es sich um redundante Gene bzw. Proteine handelt (Roucourt und Lavigne 2009).

Im lysogenen Stadium temperenter Phagen kommt es zum Einbau des Phagengenoms ins Wirtsgenom, was den Genpool des Bakteriums erweitert und sich somit auch auf die metabolischen Eigenschaften auswirken kann. Der Einfluss kann dabei sehr unterschiedlich ausfallen, entsprechend der großen Diversität an Phagen und Wirten. Bei *Corynebacterium glutamicum*, das zur Produktion von Aminosäuren verwendet wird, führte eine Reduktion der Genomgröße (um 6 %) durch Entfernung aller drei Prophagen, die normalerweise in seinem Genom enthalten sind, zu keinen signifikanten Unterschieden im Gebrauch verschiedener Kohlenstoffquellen (Baumgart et al. 2013). Hingegen konnten bei *Desulfovibrio*-Arten, Sulfat-reduzierenden Bakterien, die verschiedene temperente Phagen enthalten, im Vergleich zwischen UV-induzierten Stämmen (prophagenfrei) und Wildtyp (beinhaltet Prophagen) signifikante Unterschiede im Gebrauch von Kohlenstoffquellen und Reduktion von Metallen gezeigt werden. Die UV-induzierten Bakterienstämme konnten mehr Arten von Kohlenstoffquellen nutzen als der Wildtyp, während die Metall-Reduktion beim unbehandelten Wildtyp signifikant höher war als bei den induzierten Stämmen (Balarjishvili et al. 2021). In Versuchen an *Escherichia coli* konnte gezeigt werden, dass ein Repressorprotein, C_I, das den Übergang des Prophagen vom lysogenen in den lytischen Zustand unterdrückt, das *pckA*-Gen des Wirtsgenoms, das für die Gluconeogenese gebraucht wird, steuert. *PckA* wird dabei so herunterreguliert, dass es auf Succinat (und anderen Kohlenstoffquellen, die für die Gluconeogenese gebraucht werden) zu einem verminderten Wachstum kommt (Chen et al. 2005). Die Regulationsmechanismen sind allerdings nicht immer bekannt. In einer Arbeit zum Einfluss von Shigatoxin-(stx-)kodierenden Phagen auf Genexpression und Metabolismus von enterohämorrhagischen *E. coli* ließen sich die Änderungen der Genexpression nicht auf die Repressoren C_I oder Cro zurückführen, vermutet werden hier andere phagenkodierte Faktoren. Die stx-Phagen-tragenden *E. coli* veränderten dabei den Stoffwechsel im Vergleich zu naiven *E. coli* deutlich. Gene von Stoffwechselwegen, die für die gemischte Säuregärung von Bedeutung sind, wurden gefördert, andere Gene, die im Kohlenstofftransport und -stoffwechsel eine Rolle spielen, wurden herunterreguliert. Das zeigte sich sowohl im Wachstum auf Minimalmedium mit verschiedenen einzelnen Kohlenstoffquellen, wo moderate bis schwere Wachstumsdefekte bei Substraten wie Galaktose, Ribose und L-Laktat zu beobachten waren, als auch bei Phenotyp-Microarrays, die zu einem anderen Profil führten, als das von stx-phagenfreien *E. coli*. Die

Infektion mit stx-Prophagen scheint hier als Anpassung an die Gegebenheiten im Darm zu einer Reprogrammierung des Zellstoffwechsels zu führen (Berger et al. 2019).

2.1.3 Bakteriophagen-Einsatz im Lebensmittelbereich

In der Verwendung im Lebensmittelbereich (Nicht EU: Hier gibt es keine Zulassung für Phagen) sollen rein lytische (virulente) Phagen mit starkem lytischen Potential gegen einen oder mehrere pathogene Keime zum Einsatz kommen (Vikram et al. 2021).

Sie können dabei entlang der gesamten Produktionskette (pre- und postharvest) zur Reduktion und Beseitigung pathogener Keime eingesetzt werden. Hierbei gelangen sie zum Einsatz am lebenden Tier (Applikation über Futter, Wasser, als Spray, Waschlösung oder Injektion), am Schlachtkörper und während sämtlicher Schritte des Verarbeitungsprozesses (oft als Oberflächenbehandlung, oder bei Rohmilch: direkt beigemischt) bis hin zu bereits fertigen Produkten. Auch die Oberflächenbehandlung von Arbeitsgegenständen ist möglich und eine Wirksamkeit gegen Biofilmbildung (Gong und Jiang 2017) ist bekannt (Sillankorva et al. 2012). Für die häufigsten lebensmittelübertragenen Pathogene, wie etwa *Listeria*, *Salmonella* und *E. coli*, gibt es bereits verschiedene kommerziell erhältliche Phagenpräparate (zum Beispiel für *Listeria monocytogenes* ListexTM und ListShieldTM, für *Salmonella* spp. Salmofresh, für *E. coli* EcoShieldTM). Bei diesen Präparaten handelt es sich meist um Phagencocktails, das heißt, es kommen mehrere Phagen zum Einsatz, um ein optimales Wirkungsspektrum zu erreichen. Gezielter Einsatz einzelner Phagen ist auch möglich (Vikram et al. 2021).

Die Einsatzmöglichkeiten von Phagen werden ständig erweitert. Neuere Ansätze beschäftigen sich mit Enzymen, die im Zusammenhang mit Phagen entstehen, sie werden auch als Enzybiotics bezeichnet. Von Interesse sind dabei diejenigen, die am Ende des lytischen Zyklus gebildet werden und für den Abbau der bakteriellen Hülle sorgen, wie Endolysin. Angriffspunkt sind dabei die Peptidoglycane der bakteriellen Zellwand, sie werden abgebaut, was in Folge zur Lyse der Bakterienzelle führt (Endersen und Coffey 2020, Schmelcher et al. 2012).

Eine zusätzliche neue Anwendungsmöglichkeit ist die Detektion pathogener Keime mithilfe von Phagen. Dabei gibt es verschiedene Strategien. Beschrieben ist unter anderem die Verwendung von gentechnisch hergestellten Phagen (Reporterphagen), die das Luciferase-Gen tragen. Kommt es bei Infektion der Bakterienzelle zur Transkription dieses Gens, so zeigt die Lumineszenz das Vorhandensein vom Zielbakterium an. Eine andere Strategie wäre, dass der verwendete Phage Gene für fluoreszierende Proteine trägt und so ihre Anwesenheit signalisiert (Endersen und Coffey 2020, Hagens und Loessner 2007).

Phagenpräparate sind bereits in vielen Ländern im Einsatz, die sie aufgrund diverser Vorteile nutzen. Durch ihre hohe Spezifität greifen sie nur ihr Zielbakterium an, für tierische oder menschliche Mikroflora, die physiologischerweise vorkommt, sind sie ungefährlich. Sie beeinflussen weder Geschmack noch Textur oder Konsistenz von Lebensmitteln, denen sie beigelegt werden. Sie hinterlassen keine toxischen Rückstände und sind relativ billig. Sie schädigen weder Gebrauchsgegenstände (nicht korrosiv) noch andere Arbeitsmaterialien und sind nicht umweltschädlich (Endersen und Coffey 2020, Vikram et al. 2021).

Nachteile wären unter anderem, dass die Effektivität der Phagen stark abhängig von Faktoren wie Applikationsart bzw. Applikationszeitpunkt und Umgebungsbedingungen wie Temperatur und pH ist, was man bei der Anwendung beachten muss. Keime können gegen Phagen resistent werden (Lewis und Hill 2020). Aufgrund ihrer Spezifität kann es zu eingeschränkter Wirksamkeit kommen. Da es sich um lebende Mikroorganismen handelt, können sie durch bestimmte Desinfektionsmittel inaktiviert werden. Keimzahlen werden zwar reduziert, eine vollständige Elimination erfolgt meist nicht (Vikram et al. 2021).

Bedenken bestehen auch hinsichtlich der Übertragung von pathogenen Eigenschaften und Antibiotikaresistenzen (Garcia et al. 2008). Unsicherheiten bereiten außerdem das beschränkte Wissen über mögliche Interferenzen mit Prophagen im Zielbakterium (Wahl et al. 2019), was sich auf die Interaktion Phage und Wirt auswirken kann. Konsequenzen daraus sind nicht vorherzusagen.

2.2 Salmonellen

Bei der Gattung *Salmonella* handelt es sich um gramnegative, bewegliche (mit wenigen Ausnahmen) und fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, gehörend zu der Familie der *Enterobacteriaceae*. Die Gattung *Salmonella* umfasst zwei Arten: *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*, wobei *S. enterica* wiederum sechs Subspezies (*S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae*, *S. indica*) und über 2500 Serovare beinhaltet, die sich durch unterschiedliche Antigenmuster klassifizieren lassen (Selbitz et al. 2015). Dabei ist *S. enterica subspezies enterica* für 99 % der Salmonelleninfektionen bei Säugetieren verantwortlich. *S. bongori* und die anderen fünf Subspezies betreffen vor allem kaltblütige Tiere und sind bei Säugetieren eher selten zu finden (Jajere 2019).

Die Salmonellose ist die zweithäufigste durch Lebensmittel übertragene Krankheit (nach *Campylobacter*) in Europa (European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control 2021). Die Aufnahme der Salmonellen erfolgt für gewöhnlich über den Verzehr von kontaminiertem Fleisch (vor allem Geflügel, aber auch Schwein) und Eiern. Auch Kreuzkontamination spielt eine wichtige Rolle. Eine sichere Abtötung von Salmonellen erfolgt bei 70 °C für 15 Sekunden, während sie Einfrieren unbeschadet überstehen. Im Temperaturbereich 10-47 °C zeigen sie explosionsartiges Wachstum, wodurch bei unsachgemäßer Lagerung von Lebensmitteln leicht eine krankmachende Keimzahl (ab 100 000) erreicht wird (AGES 2021). In der Umgebung überleben sie wochen- bis monatelang aufgrund ihrer hohen Widerstandsfähigkeit (Selbitz et al. 2015).

Als Hauptverursacher der Salmonellose in Europa gelten die Serovare *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* (inklusive der monophasischen Variante), *S. Infantis* und *S. Derby*. *S. Typhi* und *S. Paratyphi* sind vor allem in den Subtropen und Tropen durch Substandards in der Hygiene zu finden, in Europa spielen sie hingegen keine Rolle. Durch ein breit angelegtes Programm der EU-Mitgliedstaaten zur Bekämpfung der Salmonellen bei Nutztieren konnte die Zahl der Salmonellose-Fälle beim Mensch seit 2004 drastisch gesenkt werden. Im Zeitraum 2015-2019 ist die Zahl konstant geblieben, überprüft durch Überwachungsprogramme auf nationaler und internationaler Ebene (European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control 2021).

2.2.1 Virulenz und Pathogenität bei Salmonellen

Verschiedene Faktoren und Mechanismen, die Adhäsivität, Invasivität, fakultativ intrazellulären Parasitismus und Toxinbildung (Endo-, Exo-, Cytotoxine) vermitteln, bestimmen die Virulenz und Pathogenität von Salmonellen (Selbitz et al. 2015). Dabei sind Oberflächenstrukturen wie Flagellin, Fimbrien und LPS beteiligt, die wichtig für die Adhäsion sind und mit dem Abwehrsystem des Wirts in Kontakt kommen, genauso wie eine Vielzahl von Effektor- und Regulatorproteinen. Sekretionssysteme, wie das Typ-III-Sekretionssystem, spielen eine wesentliche Rolle, um Effektorproteine in den intrazellulären Raum zu bekommen. Sie sorgen für Invasion und Kolonisation von Darmepithelzellen oder auch Makrophagen. Dazu beteiligen sich viele Komponenten an Abwehr und Schutz vor dem Immunsystem, oder spielen eine Rolle im Falle einer systemischen Infektion und damit verbundener Besiedelung anderer Gewebe und Organe (Fierer und Guiney 2001, Jajere 2019, Srikanth et al. 2011). Außerdem können Adaptionsmechanismen an geänderte Umgebungsbedingungen, wie Nährstoffverfügbarkeit und pH, mit dem Infektionsgeschehen eng verknüpft sein (Dandekar et al. 2015).

Salmonellen beinhalten 4,3 bis 5 Millionen Basenpaare und ca. 4000 Gene (Selbitz et al. 2015). In ihren Chromosomen finden sich Pathogenitätsinseln (*Salmonella* Pathogenitätsinseln = SPI), die neben Virulenzplasmiden, kleinen Islets und individuellen Genen, die genetische Basis für ihre Virulenz darstellen (Fierer und Guiney 2001).

Bei den SPIs handelt es sich um Gencluster in bestimmten Abschnitten von Chromosomen, die für die Kodierung verschiedener Virulenzfaktoren verantwortlich sind. Dabei sind einige SPIs häufig vorhanden, andere nur bei wenigen Serovaren (Fierer und Guiney 2001). Den bekannten SPIs werden verschiedene Funktionen zugeschrieben. So kodiert SPI-1 für ein Typ-III-Sekretionssystem, das die Invasion in Nicht-phagozytierende-Zellen und so den Eintritt in die intrazelluläre Umgebung erlaubt. SPI-2 kodiert ebenfalls für ein Typ-III-Sekretionssystem, spielt aber vor allem eine Rolle für das intrazelluläre Wachstum in Epithelzellen, das Überleben in Makrophagen und bei der Entwicklung von systemischen Infektionen. SPI-3 scheint eine wichtige Funktion in der Anpassung der Salmonellen an eine Umgebung mit niedrigem pH und niedriger Mg^{2+} -Konzentration darzustellen, wie man sie im

intrazellulären Milieu vorfindet. Von anderen SPIs ist bekannt, dass sie für Effektorproteine, Faktoren, die für das intrazelluläre Leben von Bedeutung sind, oder Adhäsine kodieren können. Auch Serovar-spezifische SPIs kommen vor, ihre Funktionen sind noch weitgehend unbekannt (Gerlach und Hensel 2007).

Neben den SPIs spielen noch weitere Gene eine Rolle: so tragen die meisten Stämme der Salmonella-Serovare Virulenzplasmide. In jedem dieser Plasmide findet sich ein *salmonella plasmid virulence (spv) locus*, auf dem *spv*-Gene liegen. Sie scheinen eine systemische Infektion zu erleichtern, bei lokaler Enteritis scheint ihr Effekt variabel zu sein, abhängig vom jeweiligen Stamm und betroffenen Wirt (Fierer und Guiney 2001).

Des Weiteren kodieren Islets (kleine genetische *Loci*) und individuelle Gene, deren Vorkommen sich nach Linien und Stämmen richtet, ebenfalls Virulenzmerkmale (Fierer und Guiney 2001). Hierzu zählt zum Beispiel das *sodCI*-Gen (kodiert für eine Superoxiddismutase), das auf einem kryptischen Phagen liegt und nur bei sehr pathogenen Serotypen gefunden wurde, die für die Entwicklung einer Bakteriämie beim Menschen verantwortlich waren (Fang et al. 1999).

Die Salmonellaserovare und Stämme können sich erheblich in ihrer genetischen Zusammensetzung unterscheiden, was zu Unterschieden in Phänotyp, Wirtsspezifität und Krankheitsbildern führt. Ein Vergleich von *S. Typhi*, ein sehr wirtsspezifisches Serovar, das mit systemischen Infektionen in Verbindung gebracht wird, mit *S. Typhimurium*, ein Serovar mit breitem Wirtsspektrum, das meist zu lokaler Gastroenteritis führt, zeigte vor allem große Unterschiede in Phagen, Plasmiden und SPIs, neben den lange bekannten Unterschieden in Genen, die für Fimbrien, Flagellen und Kapselbildung verantwortlich sind (Sabbagh et al. 2010).

Aber auch innerhalb eines Serovars ist eine große Diversität möglich: Im Falle von *S. Typhimurium* sind neben den häufigen Stämmen mit breitem Wirtsspektrum, die zu einer lokalen Gastroenteritis führen, auch wirtsadaptierte Varianten, bei denen es zu einer systemischen Infektion kommen kann, bekannt (Rabsch et al. 2002).

Die große phänotypische Diversität bei Salmonellen scheint vor allem auf genetischen Variationen in zwei Klassen von *Loci* zu beruhen. Einerseits sind dies Gene die für

Oberflächenstrukturen kodieren, andererseits spezifische Virulenzgene, die die Wirtszellphysiologie modifizieren oder das Bakterium vor dem Immunsystem schützen. (Fierer und Guiney 2001).

2.2.2 Salmonellaphagen und -prophagen und ihr Beitrag zur Pathogenität

Schon viele Bakteriophagen, die für Salmonellen spezifisch sind, konnten dank Sequenzierungsprojekten entdeckt werden. Nach Analyse der Hauptgene (Core-Genom-Analysis) können sie in fünf Gruppierungen (P27-like, P2-like, lambdoid, P22-like, T7-like) sowie drei Orphans (= Ausnahmefälle: ϵ 15, KS7, Felix O1) eingeteilt werden (Kropinski et al. 2007).

Viele von ihnen gehören den *Caudovirales* an, von der Wirtsspezifität her sind sie sehr unterschiedlich: sie reicht von Phagen, die praktisch alle Salmonellen befallen können (z. B.: Felix O1, rein lytisch, lysiert über 99 % der an ihm getesteten Salmonellen) bis hin zu hoch spezifischen, die nur einzelne Stämme befallen (beim Phagetyping wird diese unterschiedliche Wirtsspezifität genutzt, um unbekannte Salmonellaisolate Serovaren und Stämmen zuzuordnen). Es sind sowohl virulente als auch temperente unter ihnen zu finden. Dass *S. Typhimurium* symbiontische Phagen im Genom trägt, ist schon lange bekannt. Üblicherweise handelt es sich dabei nicht nur um einen Bakteriophagen, sondern meist um vier bis fünf (Kropinski et al. 2007). Trägt ein Bakterium mehrere Prophagen, so nennt man dies Polylysogenie. Auch defekte Prophagen, Phagen, die Teile ihres Genoms verloren haben und keine Viruspartikel mehr produzieren können, oder Prophagen-Reste können im Genom enthalten sein. (Brüssow et al. 2004, Wahl et al. 2019).

Das Verhalten ihrer Wirtszellen unterstützen Phagen auf vielfältigen Wegen: Salmonella-Prophagen können verschiedene Virulenzgene tragen, die für Adhäsion, Eintritt in und Manipulation von der Wirtszelle sowie für ein intrazelluläres Überleben wichtig sind. Neben anderen Proteinen und Enzymen (wie z. B. Superoxiddismutasen: schützen Bakterien vor freien Sauerstoffradikalen, die von Makrophagen produziert werden) sind vor allem phagenkodierte Effektorproteine der Typ-III-Sekretionssysteme von SPI-1 und SPI-2 von

Bedeutung (Brüssow et al. 2004, Kropinski et al. 2007, Wahl et al. 2019). Beispiele für phagenkodierte Virulenzfaktoren wären bei den Phagen der lambdoiden Gruppe Fels-1 mit *nanH* (kodiert für eine Neuramidase) und *sodCIII* (kodiert für eine Superoxiddismutase) (Figuera-Bossi et al. 2001) oder Gifsy-2, der *gtgE* und *sodCI* trägt, die beide für die Virulenz von entscheidender Bedeutung sind (Ho et al. 2002).

Einen weiteren Beitrag leisten integrierte Prophagen zum Schutz ihrer Wirtszelle: Die Integration von Prophagen kann die Infektion mit anderen Phagen (Superinfektion) über verschiedene Mechanismen verhindern. Einer davon ist die Serotyp-Konversion (verändert O-Antigen von LPS). Sie tritt bei vielen Phagen auf und vermittelt nicht nur einen Schutz vor Superinfektion mit anderen Phagen: durch die Änderungen der Zelloberfläche kann das Bakterium auch von dem Immunsystem des Wirts schlechter identifiziert und angegriffen werden. Auch andere Modifizierungen der Zelloberfläche können phagenvermittelt sein, wie eine Veränderung des LPS durch Glykosylierung, Acetylierung, Veränderungen der glykosidischen Bindungen oder Phasenvariation (temporäre Änderung von Oberflächenstrukturen) (Fierer und Guiney 2001, Kropinski et al. 2007, Wahl et al. 2019).

Möglicherweise unterstützen *Salmonella*-Phagen auch regulatorisch, durch Kontrolle von Genen ihres Wirtes: Cenens et al. (2013) zeigten, dass der *S. Typhimurium* Phage P22, wenn er sich in Pseudolysogenie befindet, ein Protein kodiert, das auf das *dgo*-Operon des Wirtes wirkt. Gene dieses Operons spielen eine Rolle in Aufnahme und im Metabolismus von D-Galactonat während der intrazellulären Phase der Salmonelleninfektion. Das phagenkodierte Protein hob dabei die Unterdrückung der *dgo*-Gene auf. Ob und welche Bedeutung das im Verlauf einer Infektion haben könnte, ist allerdings unklar (Cenens et al. 2013).

Viele der bekannten Salmonellaphagen sind außerdem zur generellen Transduktion befähigt und tragen somit zur Verbreitung von Bakteriengenen bei (Kropinski et al. 2007). In dem Zusammenhang der Verbreitung neuer Eigenschaften könnte auch das Phänomen der Rekombination zwischen Phagen von Interesse sein: Beispielsweise kann Fels-2 (aus der P2-Gruppe) mit anderen, nicht verwandten Phagen rekombinieren (P22). Dabei entsteht F22, ein Phage, der morphologisch und serologisch Fels-2 entspricht, mit den Genen von P22

(Yamamoto 1968). Auch defekte Prophagen im Genom können durch Rekombination wiederhergestellt werden, wenn sie nicht zu stark degradiert sind (Wahl et al. 2019).

2.2.3 Nachweis und Differenzierung von Salmonellen

Für den Nachweis von Salmonellen stehen, wie bei allen Infektionserregern, sowohl direkte als auch indirekte Methoden zur Verfügung, wobei indirekten Nachweisen, wie der gegen Salmonellen gerichteten Antikörperbildung, eher eine Bedeutung bei der Überwachung der Herdengesundheit zukommt. Die üblicherweise verwendeten Methoden sind direkte Nachweise, die auf genotypischen (basierend auf der genetischen Zusammensetzung) und phänotypischen (morphologisch, physiologisch, biochemisch) Merkmalen basieren. Der kulturelle Nachweis, mit anschließender Bestätigung durch biochemische Reaktionen (aufgrund charakteristischer Enzymausstattung der Erreger) und eine serologische Identifizierung sind Standard in der Lebensmittelhygiene. Leitlinien und Richtlinien geben konventionelle Diagnostik vor, sie basieren dabei auf dem internationalen Standard, der in ISO 6579-1:2017 festgelegt ist. Beschrieben wird hier das horizontale Verfahren zur Salmonellendetektion in der Lebensmittelkette (Lee et al. 2015, Selbitz et al. 2015).

Das konventionelle kulturelle Verfahren gliedert sich in einzelne Schritte. Begonnen wird mit einer nicht selektiven Voranreicherung, um die Keimausbeute zu erhöhen, gefolgt von einer selektiven Anreicherung, die das Wachstum der Salmonellen fördern und im Gegenzug das Wachstum anderer Keime (durch beigefügte Hemmstoffe wie Galle oder Brillantgrün) hemmen soll (ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain, Lee et al. 2015, Selbitz et al. 2015).

Im nächsten Schritt wird auf festen selektiven Nährböden kultiviert, die Böden sind dabei auf die Bedürfnisse der Salmonellen abgestimmt, während sie andere Erreger im Wachstum hemmen. Gleichzeitig sind sie auch Differentialnährböden, die spezifische Stoffwechselparameter nützen, um so verdächtige Kulturen erkennen zu können. Laut ISO 6579-1:2017 müssen zwei Nährböden verwendet werden, einer davon Xylose-Lysin-Desoxycholat-(XLD-)Agar. Der XLD-Agar ist ein mäßig selektives Differentialmedium zur

Isolierung und Differenzierung von gramnegativen enterischen Pathogenen. Genutzt wird eine Kombination enzymatischer Eigenschaften, die zu charakteristischen Farbänderungen führen und so Kolonien von Salmonellen erkennbar machen. Typisch ist hier das schwarze Zentrum der Kolonien mit einer leicht transparenten rötlichen Zone entsprechend einer Farbänderung des Indikators. Andere Nährböden nutzen ebenfalls ein oder mehrere biochemische Merkmale (Selbitz et al. 2015, ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain).

Anschließend erfolgt die biochemische und serologische Bestätigung. Dazu werden verdächtige Kolonien entnommen und auf weiteren Nährböden (als Reinkultur) angezüchtet. Verwendet werden Drei-Zucker-Eisen-Agar (TSI), Harnstoff-(Urea-)Agar und L-Lysin-Decarboxylase-Agar. Laut ISO 6579-1:2017 sind die Detektion auf β -Galactosidase und der Indoltest optional durchzuführen. Ebenfalls müssen serologische Tests zur Bestätigung und Typisierung durchgeführt werden. Salmonellen werden durch Detektion von drei Oberflächenantigenen identifiziert: das somatische (O-)Antigen, das flagellare (H-)Antigen und das Kapselantigen (Vi). Der Nachweis von O-, Vi- und H-Antigenen erfolgt durch Agglutination mit entsprechenden Seren (nach Ausschluss von Selbstagglutination), mit anschließender Einteilung in Serovare nach dem White-Kauffmann-LeMinor-Schema. Salmonellen sind O-, Vi- oder H-positiv (Lee et al. 2015, Selbitz et al. 2015, ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain).

Alle Isolate, die durch Bestätigung als Salmonellen eingestuft werden und all jene Isolate, die verdächtig sind (typische biochemische Reaktionen, untypische Serologie oder umgekehrt), müssen schließlich zur endgültigen Bestätigung an anerkannte Referenzlabore gesendet werden, wo auch eine genauere Bestimmung (Serotypisierung, Lysotypisierung, Resistenzbestimmung) möglich ist (Lee et al. 2015, Selbitz et al. 2015, ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain).

Da die Diagnostik in Lebensmitteln, Futtermitteln, Umwelt und latent infizierten Tieren aufgrund niedrigerer Keimzahlen schwieriger ist, als in klinischen Isolaten oder Sektionsmaterial, findet vor allem bei den angewandten Methoden im Lebensmittelbereich ein ständiger Fortschritt statt (Selbitz et al. 2015). Verfahren sollen dabei einfach, schnell und

kosteneffizient mit hoher Spezifität und Sensitivität sein. Neben konventionellen Verfahren kommen alternative schnelle Detektionsmethoden zum Einsatz (Lee et al. 2015).

Schnelle Detektionsmethoden basieren auf unterschiedlichen Strategien. ELISA, Latex-Agglutinationstest und Immunodiffusions-Assay nutzen als Grundlage immunologische Reaktionen. Dabei binden mono- oder polyklonale Antikörper spezifisch Kapselantigene (somatische oder flagelläre). Nukleinsäuren-basierende Methoden nutzen eine spezifische Nukleinsäure-Sequenz als Zielstruktur. Besonders wichtige Techniken bei diesen Tests sind PCR und Hybridisierung. Ein Vorteil ist hier, dass auch niedrige Keimzahlen durch Amplifizierung erfasst werden. Identifikation durch Biosensoren ist ebenfalls möglich, genauso wie eine Identifikation durch miniaturisierte Multitestsysteme (Lee et al. 2015).

Die miniaturisierten Multitestsysteme beruhen auf der Identifizierung von Mikroorganismen durch charakteristische, biochemisch relevante Reaktionen. Sie funktionieren analog der konventionellen biochemischen Bestätigung, nur dass hier mehrere Tests in Kammern oder auf Mikrotiterplatten (je nach verwendetem Produkt) räumlich voneinander getrennt gleichzeitig ablaufen. Je nach verwendetem Testsystem beinhalten sie 10-20 Medien (Substrate), die auf den untersuchten Mikroorganismus abgestimmt sind. Der Materialverbrauch ist dabei geringer, die Spezifität und Sensitivität liegen bei 95 % (vor allem bei den neueren Testsystemen) (Lee et al. 2015). In Evaluierungen (1970 bis 1990) für Enterotube II (BD Diagnostics, Sparks, MD) und API 20E (bioMérieux sa, Marcy-l'Etoile, France) zeigte sich bei guten Identifizierungsergebnissen eine unterschiedliche Zufriedenheit mit den Ergebnissen der einzelnen biochemischen Reaktionen. Während bei sämtlichen Reaktionen nur selten bis vereinzelt falsch positive oder negative Ergebnisse auftraten (Thomforde et al. 1973), zeigte die Citrat-Reaktion von allen Reaktionen am häufigsten unbefriedigende Ergebnisse, vor allem durch falsch negative Reaktionen (Thomforde et al. 1973, Shayegani et al. 1978, Hayek und Willis 1984, Holmes 1989).

Vom Prinzip her funktionieren die Multitestsysteme einfach: eine Reinkultur des zu untersuchenden Isolats wird mit dem Testsystem inokuliert und für 24 Stunden (es gibt auch sehr schnelle Systeme, die nur vier Stunden benötigen) bei vorgegebener Temperatur inkubiert. Ergebnisse sind anhand von Farbumschlägen optisch zu erkennen, durch

Zuordnung einer Zahl zu jedem Test ergibt sich ein numerischer Code, der manuell mit Codebuch oder automatisiert mit Datenbank zugeordnet wird. Häufig verwendete Testsysteme sind zum Beispiel API 20E (bioMérieux sa, Marcy-l'Etoile, France) oder Enterotube II (BD Diagnostics, Sparks, MD), die bereits sehr lange am Markt sind (Lee et al. 2015). Der in dieser Arbeit verwendete EnteroPluri-Test (Firma diagnostici Liofilchem, Italy) ist das baugleiche Nachfolgeprodukt des Enterotube II (BD Diagnostics, Sparks, MD) (Mibius 2022).

2.2.4 Biochemische Eigenschaften der Salmonellen

Da die Enzymausstattung der verschiedenen Bakterien sehr unterschiedlich ausgeprägt ist, finden charakteristische Stoffwechselleistungen ihre Verwendung in der Identifizierung von Mikroorganismen. Dabei lassen sich auch Salmonellen durch für sie typische biochemische Eigenschaften klassifizieren. Einige sind dabei typisch für die ganze Familie *Enterobacteriaceae* (Reduktion von Nitrat zu Nitrit, mit wenigen Ausnahmen, Oxidase negativ und Katalase positiv, außer wenige Stämme von *Erwinia* und *Yersinia*), andere sind bei den einzelnen Gattungen unterschiedlich und erlauben so eine Identifizierung (Selbitz et al. 2015, Krieg und Holt 1984).

Enterobacteriaceae können Glucose durch Fermentation (unter anoxischen Bedingungen) und Oxidation (unter Anwesenheit von Sauerstoff) abbauen, sie sind fakultativ anaerob. Für die Diagnostik wird die Fermentation unter anaeroben Bedingungen genutzt. Hierbei wird Glucose unter Gasbildung abgebaut. Salmonellen sind stets Glucose-positiv, Gasbildung ist normalerweise vorhanden, kann aber auch fehlen (*S. Typhi*). Hinsichtlich der Gärungsprodukte kann man zwei Gruppen bei den *Enterobacteriaceae* unterscheiden: diejenigen mit gemischter Säuregärung (z. B. *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*), sie bilden vor allem organische Säuren, und diejenigen mit der 2,3-Butandiolgärung, bei der nur wenig Säure gebildet wird (z. B. *Enterobacter*). Hier kommen Tests wie die Methylrotprobe (MR), die die Säurebildung anzeigt und die Voges-Proskauer-(VP-) Reaktion, bei der das Zwischenprodukt Acetoin nachgewiesen wird, das bei der Bildung der 2,3-Butandiole

entsteht, zum Einsatz. Da Salmonellen gemischte Säuregärer sind, sind sie VP-negativ und MR-positiv (Fuchs et al. 2014, Krieg und Holt 1984). Allerdings verweisen Garibaldi und Bayne (1970) darauf, dass *Salmonella* spp. durchaus in der Lage sind Acetoin (und Diacetyl) zu produzieren, zwar nicht unter den gründlich kontrollierten Bedingungen der VP-Reaktion, unter geänderten Nährstoffbedingungen aber schon (Garibaldi und Bayne 1970).

Dem Gebrauch von Zuckern als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle kommt in der Diagnostik große Bedeutung zu. Es kann eine Vielzahl verschiedenster Substrate verwendet werden. Allen gemeinsam ist, dass die bakterielle Fermentation zur Bildung saurer Produkte führt, was durch die Zugabe eines pH-Indikators sichtbar gemacht werden kann (Selbitz et al. 2015).

Bei den Disacchariden ist der Test auf Lactosefermentation ein häufig verwendeter. Dabei enthält der Nährboden Laktose, die durch eine Permease in die Zelle transportiert und dort durch das Enzym β -Galactosidase in Glucose und Galactose unter Säurebildung gespalten wird (*E. coli*). Salmonellen sind nicht befähigt Lactose zu fermentieren (Lactose-negativ, außer: *S. arizonae* und *S. diarizonae*), im Gegensatz zu den eng verwandten *E. coli*. Allerdings sind Lactose-positive Stämme von *S. Typhimurium* beschrieben. Dieses Merkmal ließ sich in einigen Fällen auf Plasmid-kodierte Gene zurückführen, bei denen Ähnlichkeiten mit dem *lac*-System von *E. coli* festgestellt wurden, wobei nicht klar ist, ob diese Eigenschaft wirklich via Plasmid unter den Bakterien verbreitet wurde (Krieg und Holt 1984, Neidhardt et al. 2005).

Andere Oligo- und Disaccharide, die in der Diagnostik Bedeutung haben, wären Trehalose, die von Salmonellen fermentiert wird und Sucrose, die normalerweise nicht fermentiert wird, wobei eine plasmidübertragene Fähigkeit zur Sucrosefermentation bei einigen *S. Typhimurium* Isolaten beobachtet wurde. Bei den Pentosen wird häufig die Überprüfung auf Arabinosefermentation genutzt, Salmonellen sind Arabinose-positiv. Wie bei *E. coli* finden sich bei *S. Typhimurium* *Ara*-Gene die entsprechende Enzyme kodieren (Neidhardt et al. 2005, Krieg und Holt 1984).

Weiters werden in der Diagnostik Polyole genutzt. Zu ihnen zählen Dulcitol (Galactitol), Sorbitol (Glucitol) und Adonitol (Ribitol). *Salmonella* spp. sind Sorbitol positiv. Bei *S.*

Typhimurium ist ein spezifischer Membrankomplex mit zwei spezifischen Enzymen für den Gebrauch von Sorbitol beschrieben. Adonitol kann nicht genutzt werden. Dulcitol kann als alleinige Kohlenstoffquelle genutzt werden, jedoch gibt es einige Ausnahmen wie *S. Typhi*, *S. Choleraesuis*, *S. arizonae* und *S. Pullorum*. (Krieg und Holt 1984, Neidhardt et al. 2005). Auch der in dieser Arbeit verwendete Stamm *S. Typhimurium* ATCC 14028, der auch für Qualitätskontrollen genutzt wird, ist Dulcitol negativ. Eine Arbeit, die sich diesem spezifischen Stoffwechselweg widmete, ließ erkennen, dass in den Gebrauch von Dulcitol mehrere Enzyme involviert sind, deren korrespondierende Gene in einem *gat*-Gencluster liegen. Bei *Salmonella*-Stämmen, die kein Wachstum auf Dulcitol zeigten, fehlten im Genom einige Gene dieses Clusters, so auch bei *S. Typhimurium* 14028s (Nolle et al. 2017).

Bei der Überprüfung des Citratgebrauchs wird bewertet, ob das Isolat Citrat als einzige Kohlenstoffquelle nutzen kann. Salmonellen sind Citrat-positiv mit einigen Ausnahmen: *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A und einigen Vertretern von *S. Gallinarum* und *S. Pullorum*. Ein häufig verwendeter Nährboden ist der Simmons-Citrat-Agar. Er beinhaltet Natriumcitrat als Kohlenstoffquelle, Ammonium-di-hydrogenphosphat als Stickstoffquelle und Bromthymolblau als Farbindikator. Das Medium ist unbeimpft grün, kommt es zu einem Abbau, entstehen alkalische Metaboliten, die Farbe ändert sich in blau (American Society of Microbiology 2022, Krieg und Holt 1984).

Die Fähigkeit Harnstoff durch das Enzym Urease zu Ammoniak und CO₂ zu hydrolysieren besitzen Salmonellen nicht, sie sind Urease-negativ. Ein häufig eingesetzter Nährboden zur Überprüfung dieser Reaktion ist der Harnstoff-Agar nach Christensen, der Phenolrot als pH-Indikator enthält. Bei Anwesenheit des Enzyms (z. B. *Proteus* spp.) kommt es durch Alkalisierung zu einem Farbumschlag, das Medium wird pink. Klinische Isolate mit der Fähigkeit der Harnstoffhydrolyse bei *S. Typhimurium* (und auch *E. coli*) sind beschrieben, bei ihnen liegen die kodierenden Gene auf einem Plasmid. Im Vergleich mit den chromosomalen Genen von *Klebsiella aerogenes* zeigte sich, dass beide aus einem Cluster mit sieben Genen bestehen, allerdings unterschieden sie sich in der Expression: die Expression plasmidkodierter Gene wurde durch die Anwesenheit von Harnstoff vermittelt (American Society of Microbiology 2022, Krieg und Holt 1984, Neidhardt et al. 2005).

Salmonellen können Phenylalanin nicht oxidativ desaminieren, sie sind Phenylalanin negativ. Auch die oxidative Desaminierung von Tryptophan fehlt ihnen. Sie wird mit der Indolreaktion überprüft: Kann Tryptophan genutzt werden, entsteht aus Tryptophan durch das Enzym Tryptophanase Pyruvat, NH_3 und Indol. Zur Überprüfung wird hier das Kovacs-Reagenz zugesetzt. Es beinhaltet p-Dimethylamino-benzaldehyd, das mit Indol reagiert, wodurch sich ein roter Komplex bildet. Salmonellen bilden kein Indol, sie sind Indol-negativ (American Society for Microbiology 2022, Krieg und Holt 1984, Neidhardt et al. 2005).

Salmonellen besitzen die Fähigkeit Schwefelwasserstoff (Dihydrogensulfid = H_2S) aus Thiosulfat ($\text{S}_3\text{O}_3^{2-}$) zu bilden. Dafür exprimieren sie zwei verschiedene Enzymsysteme, die unabhängig H_2S produzieren. Dabei handelt es sich um die Thiosulfatreduktase (PhsABC-Enzyme) und die anaerobe Sulfitreduktase (AsrABC-Enzyme), die einen alternativen Weg während eines anaeroben Wachstums darstellt. Dieses Merkmal wird als diagnostischer Test benutzt um H_2S -Bildner, wie Salmonellen, *Proteus* und *Citrobacter*, von H_2S -negativen *Enterobacteriaceae* (z. B. *E. coli*) zu unterscheiden. Durch die Sulfide zeigt sich eine schwarze Färbung auf dem XLD-Agar bzw. dem Triple-Sugar-Iron-Agar (TSI). H_2S -negative Vertreter sind viele Stämme von *S. Paratyphi* A und *S. Choleraesuis* (Krieg und Holt 1984, Neidhardt et al. 2005, Selbitz et al. 2015).

Die Aktivität von Aminosäure-Decarboxylasen wird ebenfalls gerne als Differenzierungsmerkmal herangezogen. Bei Salmonellen werden die Decarboxylasen für Lysin und Ornithin für die Diagnostik genutzt. Die Carboxylase wandelt die entsprechende Aminosäure in ein biogenes Amin um: Die Lysindecarboxylase wandelt Lysin in Cadaverin um, die Ornithindecarboxylase Ornithin in Putrescin. Sie sind pH-abhängig, sinkt der pH, steigt ihre Aktivität. Durch die Reaktion wird der pH-Wert der Umgebung angehoben (Neidhardt et al. 2005). Dies trägt wohl zum Überleben des Bakteriums in saurem Milieu bei (saurer Magen pH, Überleben in Makrophagen). Im Versuch mit Mutanten die frei von diesen Enzymen waren, konnte allerdings keine Abschwächung der Virulenz (im Mausmodell) gefunden werden (Viala et al. 2011). *Salmonella* spp. sind somit Ornithindecarboxylase-positiv (mit Ausnahme von *S. Gallinarum* und *S. Typhi*) und Lysindecarboxylase-positiv (außer *S. Paratyphi* A) (Krieg und Holt 1984).

2.2.5 Salmonellen mit atypischen biochemischen Eigenschaften

Mechanismen wie Konjugation, Transformation und Transduktion ermöglichen es Bakterien neue Eigenschaften zu erwerben (Fuchs et al. 2014). Salmonellen sind eine sehr vielfältige Art. *Salmonella enterica* beinhaltet über 2500 Serovare, worin wiederum diverse Stämme enthalten sind, mit teils streng wirtsadaptierten Vertretern, oder aber welchen mit breitem Wirtsspektrum (Selbitz et al. 2015). Dabei sind bei pathogenen Salmonellen Stoffwechsel und Pathogenese eng verknüpft. Sowohl im Lumen des Gastrointestinaltrakts als auch intrazellulär in den intestinalen Epithelzellen und phagozytierenden Zellen kommt es zu einem komplexen Zusammenspiel zwischen Wirt und Erreger, in dessen Verlauf der gesamte Stoffwechsel ständig auf die sich ändernden Situationen eingestellt wird, um erfolgreich auf konkurrierende Bakterien, variierende Nährstoffverfügbarkeit, auf das Immunsystem des Wirtes oder andere ungünstige Bedingungen reagieren zu können. Das erfolgreiche Überleben und Wachstum ist dabei von ständigen Anpassungsreaktionen begleitet, die die Situation im Wirt widerspiegeln, wobei die Mechanismen dahinter nur teilweise geklärt sind (Taylor und Winter 2020, Dandekar et al. 2015). Durch die Vielzahl an verschiedenen *Salmonella* Serovaren und Stämmen und die Besiedelung unterschiedlichster Nischen verwundert es daher nicht, dass auch immer wieder Stämme mit abweichenden biochemischen Eigenschaften gefunden werden.

Woher diese veränderten biochemischen Eigenschaften kommen, ist nicht immer bekannt. Farmer III (1975) beschreibt das Auftreten Urease-positiver *Salmonella* Cubana und vermutet, dass die Fähigkeit zur Urease-Produktion entweder auf eine Übertragung durch Konjugation (z. B.: *Proteus* könnte via Plasmid seine Urease-Fähigkeit an andere *Enterobacteriaceae* übertragen haben) oder Transduktion zurückzuführen ist, oder, dass es sich um das Ergebnis von Mutationen handelt (Farmer III et al. 1975).

Lactose-fermentierende Salmonellen können unter Isolaten verschiedener Serovare identifiziert werden. Berichte über diese Isolate kommen aus verschiedenen Ländern. Ein Lactose-positiver *S. Typhimurium* Stamm wurde in Brasilien in Sao Paulo als endemisch beschrieben. Von der Erkrankung waren meistens Säuglinge im ersten Lebensjahr betroffen und der Stamm wies Resistenzen gegen verschiedene Antibiotika auf. Ebenfalls war er gegen

Phagen resistent und somit nicht typisierbar (Falcao et al. 1975). Ein Ausbruch einer Lebensmittelvergiftung in Afrika 1982 ließ sich auf Lactose-fermentierende Isolate von *S. Tuebingen* zurückführen (Dube 1982). McDonough (2000) beschreibt sechs Ausbrüche von Salmonellose durch einen Lactose-fermentierenden Stamm von *S. Typhimurium* im Nordosten der USA bei Saugkälbern, gekennzeichnet durch einen schnellen Verlauf mit hoher Mortalität. Dazu hatten diese Salmonellen auch ein erweitertes Resistenzspektrum. Er erstellt die Hypothese, dass sich Lactose-fermentierende Salmonellen in einer Nische als Anpassung an ihre Umgebung, Nährstoffverfügbarkeit und Landwirtschaftspraktiken entwickeln. Ein Problem sieht er darin, dass diese Salmonellen durch ihr untypisches Verhalten, die Fähigkeit Laktose zu fermentieren, möglicherweise nicht immer isoliert und detektiert wurden und es so zur weiteren Verbreitung kam (McDonough et al. 2000). Leonard et al. (2015) teilen die Meinung, dass es sich um eine Anpassung an die Umgebung und an ein reichlich vorhandenes Substrat handelt. Sie stellten mittels Genomanalyse von dreizehn unterschiedlichen Lactose-fermentierenden Isolaten (gehörend zu verschiedenen Serovaren von *S. enterica* subspezies *enterica*: *S. Senftenberg*, *S. Tennessee*, *S. Indiana*, *S. Montevideo* und *S. enterica* subspezies *diarizonae*) fest, dass sich die Lokalisation der zuständigen *lac*-Gene nicht einheitlich darstellte. Bei einigen waren die *lac*-Gene in das Chromosom (*S. Tennessee*, *S. Indiana*, *S. diarizonae*) integriert, bei anderen lagen sie auf einem Plasmid (*S. Senftenberg*, *S. Montevideo*). Die Verbindung mit Insertionssequenzen war evident, was für ein sehr mobiles genetisches Element spricht, welches von Salmonellen auf verschiedenen Wegen erworben werden konnte (Leonard et al. 2015).

Lysin-Decarboxylase-negative Isolate, die in Zusammenhang mit *Salmonella enterica* serovar Enteritidis assoziierten Salmonellose Ausbrüchen gefunden wurden, wurden 2006 in Japan dokumentiert. Hierbei waren immerhin zehn von 109 untersuchten Stämmen Lysin negativ. Bei ihnen wurde eine ursächliche Punktmutation in *cadC* (Teil des *cad*-locus, der für die Lysin-Decarboxylase-Aktivität verantwortlich sein dürfte) identifiziert (Morita et al. 2006, Neidhardt et al. 2005).

Aus den letzten Jahren gibt es vermehrt Berichte über H₂S-negative Salmonellen-Stämme. Die untersuchten Isolate gehörten verschiedenen Serovaren an und wurden in verschiedenen Ländern isoliert, überwiegend in Asien. So konnten in China H₂S-negative Isolate bei den

Serovaren *S. Gallinarum*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *S. Paratyphi A*, *S. Senftenberg* und anderen isoliert werden. Gefunden wurden sie bei Proben von Geflügel, Schweinefleisch, Meeresfrüchten und klinischen Fällen humaner Patienten (Xie et al. 2015 und 2018, Yi et al. 2014). Während die H₂S-negativen Isolate von *S. Senftenberg* keinen signifikanten Unterschied in der Empfindlichkeit gegen Antibiotika im Vergleich mit den H₂S-positiven Isolaten aufwiesen (Yi et al. 2014), waren einige der anderen Isolate gegen diverse Antibiotika resistent, einige multiresistent (Xie et al. 2015 und 2018). Bei den H₂S-negativen Isolaten fanden sich verschiedene Mutationen in *phsA*, das zum *phsABC*-Operon gehört und für den Vorläufer der Thiosulfatreduktase kodiert, was zu dem Verlust der Fähigkeit H₂S zu produzieren geführt haben dürfte (Xie et al. 2015 und 2018, Yi et al. 2014).

Auch in Europa gibt es Dokumentationen H₂S-negativer Salmonellen. In Schweden gab es 2019 einen Ausbruch von Salmonellose durch nicht-H₂S-produzierende monophasische *Salmonella Typhimurium* mit 82 humanen Salmonellosen. Als Quelle wurden hier kleine Tomaten vermutet (Colombe et al. 2019). In Portugal wurde ein H₂S-negativer Stamm monophasischer *S. Typhimurium* in Geflügelfleisch nachgewiesen (Mourao et al. 2020). Dieser atypische H₂S-negative Stamm wächst unter verschiedenen limitierenden Bedingungen und scheint sowohl national als auch international verbreitet zu sein. Er könnte aufgrund seines atypischen Phänotyps schwerer zu detektieren sein. Weiters ist er metalltolerant (Metalle und organische Säuren werden als Futterzusätze und zur Oberflächendesinfektion als Antibiotikaersatz verwendet) und gegen verschiedene Antibiotika resistent (Sakano et al. 2013). Ein Zirkulieren und gehäuftes Vorkommen in der EU kann nicht ausgeschlossen werden. Bei den hier genannten Isolaten wurden ebenfalls Mutationen im *phsA*-Gen gefunden. Die verlorene H₂S-Produktion dürfte im Zusammenhang mit einer Anpassung der Salmonellen an ihre Umgebung entstanden sein und könnte auch einen Vorteil gegenüber anderen Bakterien im Darm darstellen (Mourao et al. 2020, Sakano et al. 2013).

3. Material und Methode

3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

Es wurden Prophagenlysate aus der Sammlung des Instituts zur Untersuchung verwendet, die aus vorausgegangenen Experimenten gewonnen wurden. Insgesamt wurden 40 lysogene Phagen zur Untersuchung herangezogen. Davon stammten 38 Prophagen von verschiedenen *S. Typhimurium* Stämmen, zwei von *S. Enteritidis* Stämmen (PSEs7 und PSEs18). Die Bezeichnungen der Prophagen wurden beibehalten: PS 1-5, PS 7-9, PS 11, PS 13-17, PS 19, PS 21, PS 23-28, PS 30-33, PS 35-38, PS 43-47, L18B, L36B, PSEs7, PSEs18, PS s157. Von allen verwendeten Phagen war aus vorangegangenen Experimenten bekannt, dass sie den von uns verwendeten Teststamm als Wirt nutzen.

Bei dem für die Inokulation verwendeten Bakterienstamm handelt es sich um den *Salmonella* Typhimurium Stamm ATCC 14028 WT (American Type Culture Collection).

Als Referenzstämme wurden verwendet:

- *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 WT (American Type Culture Collection)
- *Proteus vulgaris* ATCC 13915 (American Type Culture Collection)
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 3883 (American Type Culture Collection)
- *Enterobacter* (= *Enterococcus*) *faecalis* ATCC 29212 (American Type Culture Collection)

3.1.2 Testsysteme

Verwendet wurden EnteroPluri-Tests der Firma Diagnostici Liofilchem (Roseto di Abruzzi (TE) Italy, Ref. 78619).

Hierbei handelt es sich um kommerziell erhältliche Multitestsysteme, bei denen in zwölf Kammern auf 15 verschiedene biochemische Eigenschaften getestet wird. Tab. 1 gibt eine

Übersicht der biochemischen Reaktionen mit Name und Nummer der zugehörigen Kammer wieder, entsprechend der Beschreibung der im EnteroPluri-Test enthaltenen Gebrauchsanleitung:

Tab. 1: Übersicht der biochemischen Reaktionen im EnteroPluri-Test mit Name und Nummer der jeweiligen Kammer

Nummer der Kammer	Name der Kammer	Biochemische Reaktion
Kammer 1	Glucose/Gas	Glucosefermentation
		Gasbildung
Kammer 2	Lysin	Decarboxylierung von Lysin
Kammer 3	Ornithin	Decarboxylierung von Ornithin
Kammer 4	H₂S/Indol	Schwefelwasserstoffbildung (H ₂ S)
		Bildung von Indol
Kammer 5	Adonitol	Adonitolfermentation
Kammer 6	Lactose	Lactosefermentation
Kammer 7	Arabinose	Arabinosefermentation
Kammer 8	Sorbitol	Sorbitolfermentation
Kammer 9	VP	Bildung von Acetoin
Kammer 10	Dulcitol/PA	Dulcitolfermentation
		Desaminierung von Phenylalanin
Kammer 11	Urea	Harnstoffhydrolyse
Kammer 12	Citrat	Citratverwertung

Zusätzliche im EnteroPluri-Test verwendete Reagentien:

- Kovacs Reagens (Indoltest)
- Alpha-Naphthollösung 5 % (VP-Reaktion)
- Kaliumhydroxidlösung 20 % (KOH) (VP-Reaktion)

Die Reagentien stammen vom Institut und wurden nach allgemein gültigen Standards hergestellt.

Zur Überprüfung abweichender Testergebnisse wurden zusätzliche Nährmedien mit Farbindikator nach allgemein gültigen Standards hergestellt. Es waren dies:

- Simmons-Citrat-Agar
- Harnstoff-Agar nach Christensen
- Lysin-Decarboxylase-Agar

Sie werden unter Punkt 3.2.6.1-3.2.6.3 beschrieben.

3.1.3 Geräte und sonstige Materialien

- Aqua bidest.
- Autoklav
- Automatische Pipettierhilfe Powerpette Plus (VWR; JENC267-201)
- Bunsenbrenner (Schütt)
- Eppendorf Pipetten
 - Eppendorf Research Plus Pipette 10 µl (Eppendorf; 3120 000.020)
 - Eppendorf Research Plus Pipette 100 µl (Eppendorf; 3120 000.046)
 - Eppendorf Research Plus Pipette 1000 µl (Eppendorf; 3120 000.062)
- Glaseprouvetten
- Glaspipetten, autoklaviert
- Inkubator (WTB Binder; 9010-0080)
- Inkubator (Mettmert; D6064)
- Metallösen (Becker)
- Natriumchlorid (Merck; 1.06404.0500)
- NaCl 0,9 % Lösung steril
- PES-Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm (VWR International; 514-0073)
- Pipettenspitzen (Greiner Bio One)
 - 1000 µl (686290)
 - 200 µl (685290)

- 20 µl (765290)
- Reaktionsgefäß 1,5 ml (Greiner Bio-One; 616201)
- Reaktionsgefäß 2 ml (Greiner Bio-One; 623201)
- Thermoschüttler (Eppendorf; New BrunswickTM Innova 40/40R Incubator Shaker 40)
- Vortexmischer (IKA MS2 Minishaker)
- Zentrifuge (Eppendorf; 5417C)

3.1.4 Nährmedien

- Brain Heart Infusion (BHI) Broth (Oxoid; CM1135)
- LB Agar Miller (Thermo ScientificTM Oxoid 10081163)
- LB Broth (Thermo Scientific Oxoid; Luria Bertani Broth (Miller)-Oxoid; CM0996B)
- Lysin-decarboxylase-Broth (Taylor Modification)
 - Hefeextrakt (Oxoid; LP0021B)
 - Glucose (Oxoid; CM0053)
 - L-Lysine (Sigma; L5501)
 - Bromkresolpurpur (Merck; 1.03025.0025)
- Simmons-Citrat-Agar:
 - Magnesiumsulfat Heptahydrat (Merck; 1.05886.0500)
 - Ammonium-di-hydrogenphosphat (Merck; 101440.0050)
 - Natrium-ammonium-hydrogenphosphat (Merck; 6682)
 - Natrium tribasisch Dihydrat (Sigma-Aldrich; S4641)
 - Sodium chloride (Merck; 1.06404.1000)
 - Bromthymolblau (Merck; 1.03026.0005)
 - Bakteriologischer Agar (Thermo ScientificTM OxoidTM; 10351303)
- Urea-Agar-Base (Harnstoff Agar nach Christensen):
 - Harnstoff (Sigma; U1250-1KG)
 - Pepton (Oxoid; LP0034)
 - Glucose (Oxoid; CM0053)
 - Sodium chloride (Merck; 1.06404.1000)

- Kalium-di-hydrogenphosphat (Merck; 104873)
- Phenolrot (Roth; T127.1)
- Bakteriologischer Agar (Thermo Scientific™ Oxoid™; 10351303)

3.2 Methode

3.2.1 Herstellung einer Flüssigkultur

Aus einem bereits im Vorfeld auf LB-Agar angezüchtetem *Salmonella* Typhimurium Stamm ATCC 14028 WT wurde mittels abgeflammter Metallöse eine Kolonie entnommen und in BHI-Flüssigmedium gelöst. Diese Suspension wurde über Nacht im Thermoschüttler bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

3.2.2 Inokulation der Kultur mit lysogenen Phagen

Am darauffolgenden Tag wurden entsprechend der Probenanzahl autoklavierte Glaseprouvetten mit je 2,5 ml LB-Medium befüllt. Danach wurden je 10 µl bakterielle Suspension (Bakterien befanden sich zu diesem Zeitpunkt in der stationären Phase) aus der Flüssigkultur in jedes Röhrchen überführt. Diese kamen nun wieder zurück in den Thermoschüttler für zwei Stunden bei 37 °C und 180 rpm. Nach zwei Stunden wurde den Epprouvetten je 50 µl der zu testenden Phagenlösung zugesetzt. Vor dem Zusatz in die bakterielle Suspension wurde jede Phagenlösung gevortext. Zusätzlich wurde eine Probe angesetzt, der keine Phagen zugesetzt waren. Sie diente als Kontrolle und Vergleich. Die so inokulierten Kulturen kamen nun wieder über Nacht in den Thermoschüttler bei 37 °C und 180 rpm.

3.2.3 Pelletgewinnung

Nachdem die Epprouvetten vom Thermoschüttler entnommen wurden, wurde aus jedem Röhrchen mittels automatischer Pipettierhilfe 1 ml Probenlösung entnommen und in sterile 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt. Diese wurden bei maximalen rpm für zwei Minuten in

der Eppendorffzentrifuge (5417C) zentrifugiert. Der Überstand der jeweiligen Probe wurde danach sofort abpipettiert, das Pellet wurde mit je 1 ml sterilem 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Danach kamen sie wieder in die Zentrifuge bei maximalen rpm für zwei Minuten und der Waschschrift wurde wiederholt. Im Anschluss an den zweiten Waschschrift wurde der Überstand gründlich abpipettiert, um ein möglichst reines Pellet zu erhalten.

3.2.4 Beimpfung der EnteroPluri-Tests

Die Tests wurden gemäß Herstellerempfehlungen im Kühlschrank gelagert, vor Inokulation wurde der jeweilige EnteroPluri-Test der Packung entnommen und mit Name der Probe, Datum und Zeitpunkt der Beimpfung versehen.

Für die Beimpfung wurden die Schraubkappen entfernt, mit der Impfnadel des Testsystems so viel vom Pellet wie möglich entnommen und durch alle Kammern des Systems inokuliert. Die Impfnadel wurde im Testsystem belassen und an vormarkierter Einkerbung abgebrochen, die Schraubverschlüsse wieder aufgesetzt und mit dem abgebrochenen Teil der Impfnadel die Plastikfolie im Bereich der Löcher der Kammern Adonitol, Lactose, Arabinose, Sorbitol, VP, Dulcitol/PA, Urea und Citrat durchstoßen um die Umgebung aerob zu halten.

Die Tests kamen nun zur Bebrütung für 18-24 Stunden bei 36 +/- 1 °C in den Inkubator.

3.2.5 Auswertung der Testergebnisse

Die Tests wurden nach der vom Hersteller empfohlenen Bebrütungszeit von 18-24 Stunden aus dem Inkubator geholt, die Farbumschläge der einzelnen Kammern beurteilt und als Testergebnisse notiert (eine Übersicht über das Erscheinungsbild bei positiven und negativen Reaktionen liefert Tab. 2). Positive Tests waren gemäß eines Farbumschlags zu erkennen, negative zeigten keinen. Hierfür gab es eine mitgelieferte Reaktionstabelle mit Farbskala und Beschreibung der Farbreaktionen. Zusätzlich wurde mit der Kontrollprobe, die nur *S. Typhimurium* ATCC 14028 WT, ohne Phagen, enthielt, verglichen.

Im Anschluss wurde bei jedem Testsystem der Indoltest durchgeführt. Hierzu wurde der jeweilige Test mit der flachen Seite nach oben gelegt, die Plastikfolie perforiert und 3-4

Tropfen Kovacs-Reagenz in die H₂S/Indol Kammer injiziert. Das Ergebnis wurde nach 15 Sekunden abgelesen.

Des Weiteren wurde auch der Voges-Proskauer-Test durchgeführt. Hierbei wird das Testsystem wiederum mit der flachen Seite nach oben gelegt, danach werden je drei Tropfen Alpha-Naphthol und zwei Tropfen Kaliumhydroxid unter die Folie der Kammer VP injiziert. Das Ergebnis wurde nach 20 Minuten abgelesen.

Tab. 2: Erscheinungsbild positiver und negativer Reaktionen im EnteroPluri-Test

Kammer	Biochemische Reaktion	Farbe positiv	Farbe negativ
1: Glucose/Gas	Glucosefermentation	gelb	Rot
	Gasproduktion	Wachsabhebung	Keine Wachsabhebung
2: Lysin	Decarboxylierung von Lysin	violett	Gelb
3: Ornithin	Decarboxylierung von Ornithin	violett	gelb
4: H ₂ S/Indol	Bildung H ₂ S	schwarzbraun	Beige
	Bildung Indol	rosarot	farblos
5: Adonitol	Adonitolfermentation	Gelb	rot
6: Lactose	Lactosefermentation	Gelb	Rot
7: Arabinose	Arabinosefermentation	Gelb	Rot
8: Sorbitol	Sorbitolfermentation	gelb	Rot
9: VP	Bildung von Acetoin	rot	Farblos
10: Dulcitol/PA	Dulcitolfermentation	gelb	grün
	Desaminierung von Phenylalanin	dunkelbraun	grün
11: Urea	Harnstoffhydrolyse	pink	beige
12: Citrat	Citratverwertung	blau	grün

3.2.6 Überprüfung der Testergebnisse

Um vom phagenfreien *S. Typhimurium* Stamm ATCC 14028 WT abweichende Ergebnisse zu überprüfen wurden zusätzliche Tests durchgeführt.

Bei biochemischen Eigenschaften die sich nur selten verändert hatten wurden erneut EnteroPluri-Tests mit den fraglichen Proben inokuliert. Für drei häufig veränderte biochemische Eigenschaften wurden zusätzliche Nährböden hergestellt und verwendet.

3.2.6.1 Überprüfung der Verwertung von Citrat als einziger Kohlenstoffquelle

Hergestellt wurde Simmons-Citrat-Agar nach der Rezeptur von Oxoid (OXOID; CM0155) (ThermoFisher Scientific Inc, 2022):

Komponenten:

Magnesiumsulfat 0,2 g/l

Ammonium-di-hydrogenphosphat 0,2 g/l

Natrium-ammonium-hydrogenphosphat 0,8 g/l

Natriumcitrat, tribasisch Dihydrat 2,0 g/l

Natriumchlorid 5,0 g/l

Bromthymolblau 0,08 g/l

Agar 15,0 g/l

pH 7,0 +/- 0,2 bei 25 °C

Die aufgezählten Komponenten des Mediums wurden unter Aufkochen in 1000 ml bidestilliertem Wasser suspendiert und 15 Minuten lang bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde der fertige Simmons-Citrat-Agar in 15 ml Röhrchen zupipettiert, je 5 ml pro Röhrchen. Bis zum Aushärten des Agars wurden die Röhrchen schräg gelagert.

Das hergestellte Medium wurde bei 2-8 °C gelagert.

Zur Überprüfung der Proben auf die Verwertung von Citrat wurde das jeweilige zu untersuchende transduzierte Bakterium (Bakterienphagenpellet) (hergestellt wie unter Punkt 3.2.1-3.2.3 beschrieben) mittels Impföse aus dem Röhrchen entnommen und auf einem

Schrägagar ausgestrichen, bei 35 °C inkubiert und nach 24 und 96 Stunden beurteilt. Es wurde der Bakterienstamm ATCC 14028 WT mit jeweils einem der 40 zu untersuchenden Phagen transduziert und überprüft. Als Negativ-Kontrolle wurden *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 und *Proteus vulgaris* 13915 getestet. Als doppelte Positiv-Kontrolle diente *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 WT.

Können Mikroorganismen Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen, so wachsen sie auf diesem Medium und bewirken eine alkalische Reaktion, die durch einen Farbumschlag des Indikators von grün zu blau sichtbar wird (Thermo Fisher Scientific Inc, 2022).

3.2.6.2 Überprüfung der Urease-Aktivität

Hergestellt wurde ein Harnstoff-Agar nach Christensen nach der Rezeptur der American Society for Microbiology (American Society for Microbiology, 2022):

Komponenten:

Harnstoff 20 g/l

Pepton 1,0 g/l

Glucose 1,0 g/l

Natriumchlorid 5,0 g/l

Kalium-dihydrogenphosphat 2,0 g/l

Phenolrot 0,012 g/l

Agar 15,0 g/l

pH 6,8 +/- 0,2

20 g Harnstoff wurden in 100 ml destilliertes Wasser suspendiert und sterilfiltriert mithilfe eines 0,2 µm PES-Spritzenvorsatzfilters. Die anderen Komponenten wurden separat in einem anderen Gefäß unter Aufkochen in 900 ml destillierten Wasser suspendiert und 15 Minuten autoklaviert. Danach wurde auf 50 °C abgekühlt und mit der sterilen Harnstofflösung

vermischt. Das fertige Medium wurde in 15 ml Röhrchen pipettiert, je 5 ml pro Röhrchen. Bis zum Aushärten des Agars wurden die Röhrchen schräg gelagert. Das fertige Medium hatte hell-gelb-orange Farbe.

Zur Überprüfung der Urease-Aktivität wurde mittels Impföse das jeweilige zu untersuchende transduzierte Bakterium (Bakterienphagenpellet) (hergestellt wie unter Punkt 3.2.1-3.2.3 beschrieben) dem Röhrchen entnommen und auf Schrägagar ausgestrichen. Danach wurden die Proben bei 37 °C inkubiert. Ergebnisse wurden wiederum nach 24 und 96 Stunden abgelesen. Es wurden alle 40 Proben überprüft. Als Positiv-Kontrolle wurden *Proteus vulgaris* ATCC 13915 und *Klebsiella pneumoniae* ATCC 3883 verwendet, als doppelte Negativ-Kontrolle wiederum *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 WT.

In Gegenwart des Enzyms Urease wird Harnstoff in Kohlendioxid und Ammoniak gespalten, was sich durch den pH-Indikator Phenolrot als Farbreaktion beobachten lässt. Bei positivem Ergebnis verändert sich die Farbe von gelb zu pink bis purpur, bei negativem Ergebnis bleibt das Medium gelblich, bzw. rein gelb (American Society of Microbiology, 2022).

3.2.6.3 Überprüfung der Lysindecarboxylase-Aktivität

Hergestellt wurde ein Lysin-Decarboxylase-Agar (Taylor Modification) nach der Rezeptur von Oxoid (OXOID; CM0308) (Thermo Fisher Scientific Inc, 2022):

Komponenten:

Hefeextrakt 3,0 g/l

Glucose 1,0 g/l

L-Lysin 5,0 g/l

Bromokresolpurpur 0,016 g/l

pH 6,1 +/- 0,2 bei 25 °C

Die Komponenten des Mediums wurden in 1000 ml destilliertem Wasser durch Erhitzen gelöst und bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert. Im Anschluss wurde der Agar in 15 ml Röhren pipettiert, je 5 ml pro Röhren.

Zur Überprüfung der Lysin-Decarboxylase-Aktivität wurde das jeweilige zu untersuchende transduzierte Bakterium (Bakterienphagenpellet) (hergestellt wie unter Punkt 3.2.1-3.2.3 beschrieben) dem Röhren entnommen und in das flüssige Medium inokuliert. Es wurden die fraglichen Proben PS 1, 11, 16, 26 und PSE s18 getestet. Als Negativ-Kontrolle wurden *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 und *Proteus vulgaris* 13915 verwendet. Inkubiert wurde im Anschluss bei 35 °C, ausgewertet nach 24 und 96 Stunden.

Bei positiver Reaktion kommt es zu einer Farbveränderung von gelb zu violett, ist die Reaktion negativ bleibt das Medium gelb (Thermo Fisher Scientific Inc, 2022).

4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung des Phagentiters

Um die Transduktion von *S. Typhimurium* ATCC 14028 einheitlich durchführen zu können wurde die Konzentration der Phagen im Vorfeld mittels Verdünnungsreihen ermittelt. Sie betrug für PS 1 $5 \cdot 10^4$ PFU/ml, PS 2 $3 \cdot 10^3$ PFU/ml, PS 8 $5 \cdot 10^4$ PFU/ml, PS 9 $2 \cdot 10^4$ PFU/ml, PS 17 $6 \cdot 10^2$ PFU/ml, PS 28 $4,5 \cdot 10^7$ PFU/ml. Alle anderen Prophagen hatten die Konzentration 10^5 PFU/ml. Sie wurden allesamt steriltfiltriert und nach institutsinternen Standards gekühlt aufbewahrt bis zu ihrer Verwendung.

4.2 Ergebnisse der EnteroPluri-Tests

Mit dem Multitestsystem EnteroPluri-Test wurden Proben, die mit 40 verschiedenen Phagen transduziert wurden, auf Veränderung von 15 biochemischen Eigenschaften überprüft.

Die laut Hersteller beim Testsystem zu erwartenden Reaktionen und die tatsächlich beobachteten Reaktionen für *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (= WT 14028) sind in Tab. 3 zusammengefasst:

Tab. 3: Übersicht zu erwartende Reaktionen und tatsächliche Reaktionen ATCC 14028. + ist positive Reaktion, - ist negative Reaktion; Abgekürzte Namen der Kammern: Glu = Glucose, Lys = Lysin, Orn = Ornithin, Ind = Indol, Ad = Adonitol, Lac = Lactose, Ara = Arabinose, Sor = Sorbitol, Dul = Ducitol, Cit = Citrat

	Glu	Gas	Lys	Orn	H ₂ S	Ind	Ad	Lac	Ara	Sor	VP	Dul	PA	Urea	Cit
Reaktionen laut Hersteller	+	+/-	+	+/-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+/-
Reaktionen phagenfreier WT 14028	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+

Der von uns als Referenz mitgeführte WT 14028 entsprach also den zu erwartenden Eigenschaften mit Ausnahme der vorletzten Kammer, Urea (Harnstoffhydrolyse) (siehe Abb. 1). Da für den Stamm *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 WT bekannt war, dass er eine negative Reaktion liefert, wurde er wiederholt getestet. Hierzu wurde einerseits die pelletierte Version herangezogen, aber auch eine Kultur aus dem angezüchteten Stamm und eine neu angezüchtete Kultur. Alle lieferten das gleiche Ergebnis, und stellten sich, abweichend von der Beschreibung, Urease-positiv dar. Die Harnstoffhydrolyse wurde somit nachfolgend auf einem eigenen Nährboden überprüft.



Abb. 1: EnteroPluri-Test von WT 14028: Kammern mit Reaktionen: (+) ist positiv, (-) ist negativ. von links nach rechts: Glucose (+)/Gas (+), Lysin (+), Ornithin (+), H₂S (+)/Indol (-), Adonitol (-), Lactose (-), Arabinose (+), Sorbitol (+), VP (-), Dulcitol (-)/PA (-), **Harnstoff (+), Citrat (+)**

Bei den 40 getesteten transduzierten Bakterien entsprachen neun der 15 getesteten Eigenschaften immer den Reaktionen des phagenfreien *S. Typhimurium* Stammes ATCC 14028 WT und zeigten somit keinen Unterschied. Es waren dies die biochemischen Eigenschaften Glucosefermentation, Ornithindecaboxylierung, Bildung von Indol, Adonitol-, Lactose-, Arabinose-, Sorbitol- und Dulcitolfermentation. Sie sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Unveränderte biochemische Eigenschaften im EnteroPluri-Test nach Phageninokulation; + = positive Reaktion, - = negative Reaktion

	Reaktion aller 40 Proben	Reaktion phagenfreier WT 14028	Anzahl abweichende Proben
Glucosefermentation	+	+	0
Decarboxylierung von Ornithin	+	+	0
Indolbildung	-	-	0
Adonitolfermentation	-	-	0
Lactosefermentation	-	-	0
Arabinosefermentation	+	+	0
Sorbitolfermentation	+	+	0
Phenylalanin-Desaminierung	-	-	0
Dulcitolfermentation	-	-	0

Von den 15 getesteten biochemischen Eigenschaften zeigten sich bei sechs Eigenschaften Abweichungen. Die veränderten biochemischen Eigenschaften sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Tab. 5: Veränderte biochemische Eigenschaften im EnteroPluri-Test nach Phageninokulation

	Anzahl der Proben mit positiver Reaktion	Anzahl der Proben mit negativer Reaktion	Anzahl der vom WT 14028 abweichenden Proben
Gasbildung aus Glucose	39	1	1
H₂S-Bildung	39	1	1
Lysin-decarboxylierung	35	5	5
VP-Reaktion	3	37	3
Citratverwertung	16	24	24
Harnstoff-hydrolyse	4	36	36

Zwei Eigenschaften waren dabei bei je einer Probe verändert: Bei einer Probe konnte keine Gasproduktion festgestellt werden, eine war H₂S-negativ.

Zwei weitere Eigenschaften waren selten verändert: dies waren Lysindecaboxylierung, negativ bei fünf Proben, und VP-Reaktion, positiv bei drei Proben. Dazu zeigt Abb. 2 eine VP-positive Probe im Vergleich zu einer VP-negativen, Abb. 3 eine Lysindecaboxylase-negative Probe im Vergleich zu einer positiven.



Abb. 2: VP-Reaktion (vierte Kammer von rechts): oben eine negative Probe (farblos), unten eine positive (rosa)



Abb. 3: Lysindecaboxylierung (Ausschnitt vergrößert): in der zweiten Kammer (von links): negative Probe unten (gelb) im Vergleich zu positiver Probe oben (lila)

Häufige Veränderungen gab es bei der Citrat-Verwertung, sie war, dem phagenfreien Stamm entsprechend, nur bei 16 Proben positiv, 24 Proben zeigten eine negative Reaktion. Einige Beispiele für die unterschiedlichen Reaktionen der Proben sind in Abb. 4 zu sehen.



Abb. 4: am Bild gezeigt: unterschiedliche Citratverwertung (Kammer ganz rechts): positiv ist blau gefärbt, negativ grün: von oben nach unten: 2 negative Proben, eine positive, 2 negative, eine positive. Zusätzlich: Die hier gezeigten Proben sind alle Urea negativ.

Des Weiteren entsprach die Harnstoffhydrolyse der mitgeführten Referenzprobe nicht der allgemeinen Beschreibung, die Proben wiederum wichen größtenteils von der mitgeführten Referenz ab und entsprachen somit wiederum der allgemeinen Beschreibung. Die Harnstoffhydrolyse wurde nachfolgend auf einem eigenen Nährboden überprüft.

Von den 40 getesteten Proben entsprach nur eine Probe in allen 15 Eigenschaften der phagenfreien Probe.

Bei dieser Probe handelte es sich um Prophagen von einem der zwei *S. Enteritidis* Stämme. Bei der zweiten Probe (des anderen *S. Enteritidis* Stammes) fanden sich Abweichungen in drei Eigenschaften (Lysindecaboxylierung, Harnstoffhydrolyse und VP-Reaktion).

Alle anderen Proben unterschieden sich von der phagenfreien Probe in einer oder mehreren Eigenschaften.

Hauptverantwortlich dafür waren Unterschiede in der Harnstoffhydrolyse, Citratverwertung oder Kombination dieser zwei Ergebnisse (siehe dazu auch Abb. 5). Während die phagenfreie Probe eine positive Reaktion in der Harnstoffhydrolyse zeigte, war das nur bei vier zu testenden Proben der Fall, die anderen 36 waren negativ. Zweithäufigster Unterschied war das Ergebnis der Citratverwertung, bei dem 24 Proben eine negative Reaktion zeigten. Abweichungen gab es je nach Probe bei ein bis maximal drei Eigenschaften. Anzahl und Art der veränderten Eigenschaften, sowie Anzahl der veränderten Proben sind in Tab. 6 dargestellt. Einen Gesamtüberblick über alle Proben sowie Eigenschaften (verändert und unverändert) bietet Tab. 7.

Tab. 6: Veränderte biochemische Eigenschaften im EnteroPluri-Test nach Anzahl und Art sowie Probenanzahl

Anzahl veränderte Eigenschaften	Veränderte Eigenschaften	Anzahl der Proben mit veränderten Eigenschaften
1	Citrat negativ (-)	2
	Urea negativ (-)	13
2	Citrat negativ (-) & Urea negativ (-)	16
	Lysin negativ (-) & Urea negativ (-)	2
	VP positiv (+) & Citrat negativ(-)	1
3	Lysin & Urea & Citrat negativ (-)	2
	Gas & Urea & Citrat negativ (-)	1
	H ₂ S & Urea & Citrat negativ (-)	1
	Lysin negativ (-) & VP positiv (+) & Urea negativ (-)	1



Abb. 5: unterschiedliche Citratverwertung und Harnstoffhydrolyse verschiedener Proben im Enteropluri-Test (erste (Citrat) und zweite (Urea) Kammer von rechts): oben: Urea und Citrat negativ, Mitte: Urea und Citrat positiv, unten: Urea positiv und Citrat negativ

Tab. 7: Ergebnisse der EnteroPluri-Tests aller Proben: WT = Wildtyp = *S. Typhimurium* ATCC 14028; darunter aufgelistet: alle Proben, benannt nach dem jeweiligen Phagen; gelb = mit dem WT übereinstimmende Eigenschaften, rot = vom Wildtyp abweichende Eigenschaften; Abgekürzte Namen der Kammern: Glu = Glucose, Lys = Lysin, Orn = Ornithin, Ind = Indol, Ad = Adonitol, Lac = Lactose, Ara = Arabinose, Sor = Sorbitol, Dul = Dulcitol, Cit = Citrat

	Glu	Gas	Lys	Orn	H ₂ S	Ind	Ad	Lac	Ara	Sor	VP	Dul	PA	Urea	Cit
WT	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
PS1	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
PS2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
PS3	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
PS4	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS5	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
PS7	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS8	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
PS9	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS11	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
PS13	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS14	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS15	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
PS16	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS17	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
PS19	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
PS21	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
PS23	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
PS24	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
PS25	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
PS26	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS27	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS28	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
PS30	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
PS31	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS32	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS33	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS35	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS36	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS37	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS38	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS43	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS44	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS45	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS46	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PS47	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
L18B	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
L36B	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
PSEs7	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
PSEs18	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
PSs157	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-

4.3 Ergebnisse der Überprüfung abweichender Testergebnisse

Für die einzeln und selten biochemisch veränderten Eigenschaften Gasbildung, H₂S-Bildung und VP-Reaktion wurden erneut EnteroPluri-Tests durchgeführt. Nach dem zweiten Durchgang entsprachen auch die fraglichen Proben den Reaktionen des Kontrollstammes, mit einer Ausnahme: Bei der VP-Reaktion einer Probe (PSs157) kam es erneut zu einem positiven Ergebnis. Alle anderen Veränderungen waren nicht reproduzierbar.

Für die häufig veränderten Eigenschaften Lysindecaboxylierung, Citratverwertung und Harnstoffhydrolyse wurden Selektivnährböden zur Überprüfung verwendet.

In Tab. 8 sind die Ergebnisse der Enteropluri-Tests den Ergebnissen nach Durchführung erneuter Enteropluri-Tests bzw. Überprüfung einzelner Eigenschaften auf speziellen Nährböden gegenübergestellt.

Tab. 8: Gegenüberstellung der Ergebnisse: Anzahl der Veränderungen im Enteropluri-Test verglichen mit Veränderungen nach einem zweiten Durchgang bzw. nach Test auf speziellem Nährboden.

Art der veränderten Eigenschaft	Reaktion WT 14028	Anzahl vom WT 14028 abweichender Proben im Enteropluri-Test & Art der Reaktion	Anzahl abweichender Proben nach 2. Enteropluri-Test oder nach Test auf speziellem Nährboden
Gasproduktion	positiv	1 (negativ)	0
H₂S	positiv	1(negativ)	0
VP	negativ	3 (positiv)	1
Lysin	positiv	5 (negativ)	0
Citrat	positiv	24 (negativ)	0
Urea	positiv	36 (negativ)	0 (WT 14028 & alle Proben negativ)

4.3.1 Ergebnisse der Harnstoffhydrolyse auf Harnstoff-Agar nach Christensen

Die Harnstoffhydrolyse wurde mittels Harnstoff-Agar nach Christensen, wie unter Punkt 3.2.6.2 beschrieben, überprüft. Da *S. Typhimurium* ATCC 14028 WT im Enteropluri-Test ein positives Ergebnis ergab, das als falsch positiv anzusehen war, wurden alle 40 Proben und der Referenzstamm geprüft. Mitgeführte Positiv-Kontrollen waren *Proteus vulgaris* ATCC 13915 und *Klebsiella pneumoniae* ATCC 3883, die auch eine positive Reaktion zeigten. Alle

Proben, einschließlich des im Enteropluri-Test wiederholt positiven *S. Typhimurium* ATCC 14028 WT, wiesen ein negatives Ergebnis auf. Die Abweichungen konnten somit nicht bestätigt werden.

4.3.2 Ergebnisse der Citratverwertung auf Simmons-Citrat-Agar

Die Citratverwertung wurde mittels Simmons-Citrat-Agar, wie unter Punkt 3.2.6.1 beschrieben, überprüft. Da die Veränderung dieser biochemischen Eigenschaft sehr häufig war, wurden alle 40 Proben zur Überprüfung herangezogen. Alle 40 getesteten Proben zeigten ein positives Ergebnis. Einige dieser Proben sind in Abb. 6 gezeigt. *S. Typhimurium* ATCC 14028 WT wurde als doppelt positive Kontrolle mitgeführt und war positiv. Als Negativkontrollen dienten *Enterobacter faecalis* ATCC 29212 und *Proteus vulgaris* ATCC 13915, sie waren negativ. Die abweichenden Testergebnisse der Enteropluri-Tests konnten somit nicht bestätigt werden.

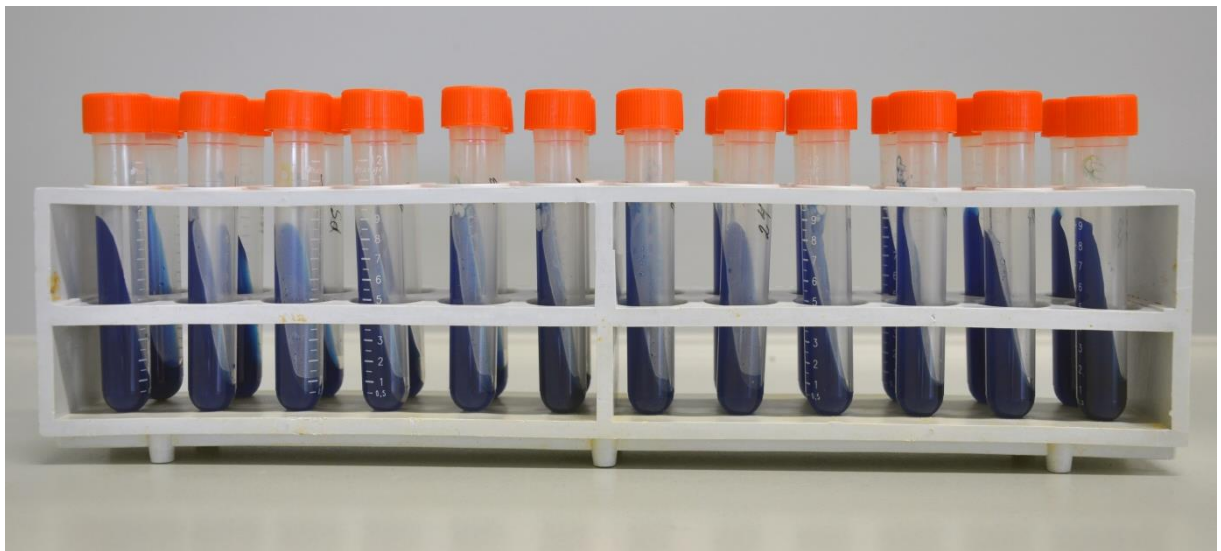


Abb. 6: Simmons-Citrat-Agar zur Überprüfung der Citratverwertung: verschiedene fragliche Proben, alle positiv (blaue Färbung)

4.3.3 Ergebnisse der Lysindecarboxylierung auf Lysin-Decarboxylase-Agar

Die Lysindecarboxylierung wurde mittels Lysin-Decarboxylase-Agar, wie unter Punkt 3.2.6.3 beschrieben, durchgeführt. Hierbei wurden die fünf fraglichen Proben mit abweichendem Testergebnis getestet. Bei allen fraglichen Proben lag eine deutliche positive Reaktion vor. Der phagenfreie *S. Typhimurium* Stamm ATCC 14028 WT wurde als doppelte positive Kontrolle mitgeführt und war positiv. Auch der als Positiv-Kontrolle mitgeführte *Klebsiella pneumoniae* Stamm war positiv. *Enterobacter faecalis* ATCC 29212 und *Proteus vulgaris* ATCC 13915 dienten als Negativ-Kontrollen und waren negativ. Die abweichenden Testergebnisse im Enteropluri-Test konnten somit nicht bestätigt werden. Abb. 7 zeigt die Proben und Kontrollstämme am Lysin-Decarboxylase-Agar.

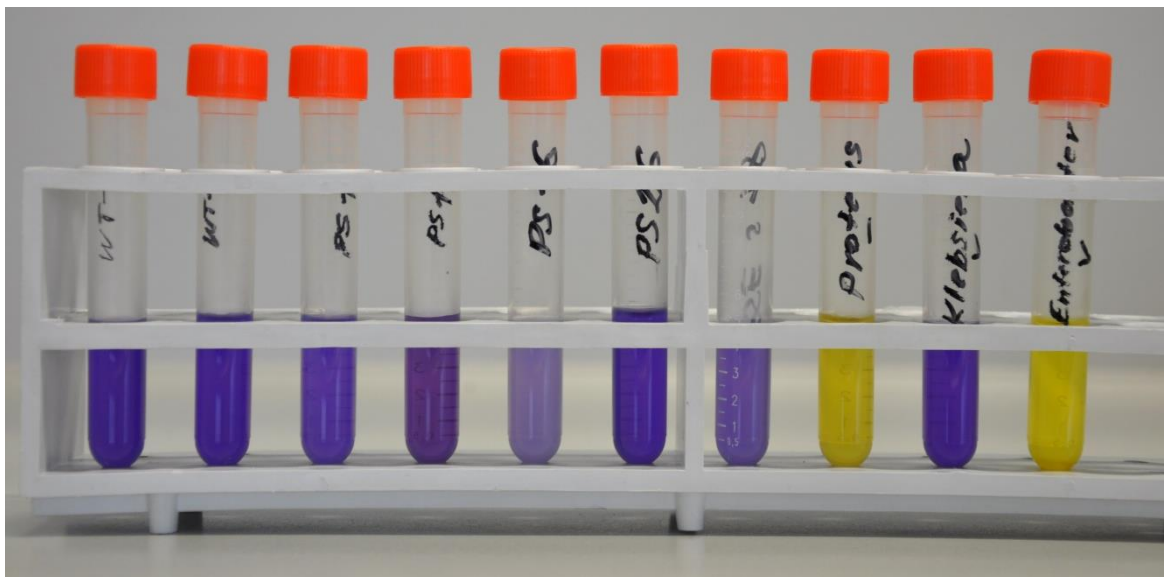


Abb. 7: Lysin-Decarboxylase-Agar: Röhrchen von links nach rechts: 2xdoppelt positive Kontrolle *S.Typhimurium* ATCC 14028, 5 fragliche Proben-hier alle positiv, negative Kontrolle *Proteus vulgaris* ATCC 13915, positive Kontrolle *Klebsiella pneumoniae* ATCC 3883, negative Kontrolle *Enterobacter faecalis* 29212

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen ob die Infektion eines phagenfreien *S. Typhimurium* Stammes mit lysogenen Phagen Auswirkungen auf dessen Metabolismus haben könnte. Besondere Bedeutung hatten die zur Identifizierung/Unterscheidung verschiedener *Enterobacteriaceae* herangezogenen biochemischen Reaktionen. Hierfür wurde der phagenfreie *S. Typhimurium* Stamm ATCC 14028 WT mit 40 verschiedenen Phagenlysaten infiziert, die aus vorangegangenen Experimenten gewonnen worden waren. Typische biochemische Eigenschaften wurden im Anschluss mit einem kommerziellen, miniaturisierten Multitestsystem (EnteroPluri-Test) überprüft. Biochemische Eigenschaften, die sich vom phagenfreien Teststamm unterschieden, wurden danach entweder mittels zweitem Testdurchgang oder auf konventionellen Nährböden überprüft. Die bei den EnteroPluri-Tests veränderten biochemischen Reaktionen ließen sich, bis auf eine, bei einer Wiederholung der Transduktion und der biochemischen Überprüfung nicht reproduzieren.

Der verwendete Bakterienstamm ATCC 14028 WT wird im EnteroPluri-Test zur Qualitätsüberprüfung herangezogen. Aus diesem Grund waren die zu erwartenden Reaktionen bekannt (siehe Punkt 4.2). Bei den Reaktionen des phagenfreien Referenzstammes im EnteroPluri-Test war ein positives Ergebnis der Harnstoffhydrolyse abweichend von der erwarteten negativen Reaktion festzustellen. Diese Reaktion war sowohl für die in dem Versuch verwendete pelletierte Version, eine direkt von LB-Agar entnommene Kultur und eine neu aus dem Originalstamm auf LB-Agar angezüchtete Kultur zu beobachten. (Interessanterweise zeigten von den 40 Phagen-infizierten Proben nur vier diese Eigenschaft. Alle anderen waren Urease-negativ im EnteroPluri-Test). Da bekannt war, dass der Referenzstamm WT 14028 eine negative Urease-Reaktion zeigt, ist dieses Ergebnis als falsch positiv zu werten. Ergebnisse der Harnstoffhydrolyse aus den EnteroPluri-Tests sind somit nicht verwertbar.

Um die Harnstoffhydrolyse zu überprüfen wurde daher auf konventionellem Nährboden getestet. Hierbei zeigte sich ein einheitliches Ergebnis für alle 40 Proben und den phagenfreien Stamm: alle waren Urease-negativ. Was zu dem konstant positiven Ergebnis im EnteroPluri-Test geführt hat ist nicht nachvollziehbar.

Auch die Verwertung von Citrat zeigte im EnteroPluri-Test häufig eine Änderung nach der Phagentransduktion, was sich allerdings auf konventionellem Nährboden nicht bestätigen ließ. Eine positive Citratreaktion bedingt einen Farbwechsel des Mediums von grün zu blau. Dies ist im gesamten EnteroPluri-Test die einzige Reaktion, die optisch bei nicht deutlich positivem Ergebnis schwerer zu bewerten ist, da alle anderen Farbreaktionen sehr deutlich zu differenzieren sind (z. B.: Glucosefermentation: rot zu gelb oder Lysin: gelb zu violett). Dass hier eventuell schwach positive Reaktionen fälschlich als negativ gewertet wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, da die Bewertung rein subjektiv erfolgt. Dazu kommt, dass laut Beipacktext des EnteroPluri-Testsystems für den Referenzstamm ATCC 14028 WT sowohl positive als auch negative Reaktionen möglich sind. Daher wurde im Anschluss auf Simmons-Citrat-Agar getestet. Im Vergleich zu dem EnteroPluri-Testsystem konnte die Citratverwertung auf konventionellem Nährboden, Simmons-Citrat-Agar, bei allen 40 Proben als eindeutig positiv bewertet werden, einschließlich der phagenfreien Referenz.

Auch die fünf im EnteroPluri-Test Lysin-Decarboxylase-negativen Proben lieferten auf Lysin-Decarboxylase-Agar ein einheitlich positives Bild, was sie von den EnteroPluri-Tests unterschied. Somit war auch für die Lysin-Decarboxylierung keine Änderung zu bestätigen.

Die einmalig veränderten Eigenschaften der Gasproduktion aus Glucose und der H₂S-Bildung waren ebenfalls nicht reproduzierbar. Während es bei Gas-Bildung, im Falle dessen, dass sie sehr schwach ausfällt zu einer Fehlinterpretation durch fehlende Wachsabhebung kommen kann, ist die H₂S-Bildung optisch eindeutig zu identifizieren. Bei einem zweiten Test fielen beide Eigenschaften eindeutig positiv aus.

Des Weiteren wurden bei drei Proben Veränderungen bei der VP-Reaktion beobachtet. Sie wurde als positiv bewertet, da sich eine deutliche Änderung der Farbe zu rosa zeigte, allerdings keine rote Farbe. Bei einem zweiten Testdurchlauf mit diesen fraglichen Proben, fiel der VP-Test für zwei negativ aus, nur eine Probe war weiterhin als positiv zu bewerten. Die im Beipacktext des EnteroPluri-Tests beschriebene Durchführung des VP-Tests, mit Menge und Reihenfolge der zugegebenen Reagentien, wurde eingehalten und kann somit als Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Auch die genannte Betrachtungszeit von 20 Minuten nach Zusatz der Reagentien wurde eingehalten und die Proben in der vorgeschriebenen

Wartezeit beobachtet. Das Ergebnis zeigte sich in dieser Zeitspanne, somit ist auch eine zu lange Wartezeit als Ursache für ein verfälschtes Ergebnis ausgeschlossen. Garibaldi und Bayne (1970) schreiben zur Acetoin-Bildung bei Salmonellen, dass *Salmonella* spp. zwar unter den gründlich kontrollierten Bedingungen der VP-Reaktion kein Acetoin und Diacetyl produzieren, unter geänderten Nährstoffbedingungen aber durchaus dazu in der Lage sind (Garibaldi und Bayne 1970). Dass sich die Nährstoffbedingungen durch Substrate anderer Kammern (etwa über die Inokulationsnadel, die durch alle Kammern verläuft) geändert haben, oder die definierte Menge an Substrat in der VP-Kammer bereits verändert war, ist aufgrund von Chargenkontrollen des Herstellers als unwahrscheinlich zu bezeichnen.

Beim EnteroPluri-Test handelt es sich um das Nachfolgeprodukt des Enterotube II (BD Diagnostics, Sparks, MD), der gemeinsam mit API 20E (bioMérieux sa, Marcy-l'Etoile, France) in Evaluierungen von 1970-1990 bewertet wurde. Bei den Bewertungen der Einzelreaktionen werden bei der Citrat-Reaktion von allen Reaktionen am häufigsten unbefriedigende Ergebnisse beschrieben, vor allem falsch negative (Thomforde et al. 1973, Shayegani et al. 1978, Hayek und Willis 1984, Holmes 1989). Seltener bis vereinzelt auftretende falsch negative Ergebnisse für Harnstoffhydrolyse, Lysin-Decarboxylierung, H₂S-Bildung und Gas-Produktion sind ebenfalls beschrieben (Thomforde et al. 1973). Falsch negative Ergebnisse lassen sich also nicht ausschließen.

Ein Faktor der auf das Testsystem Einfluss genommen haben könnte, wäre das Verwenden einer pelletierten Kultur. Durch die Verwendung des Pellets für die Beimpfung könnte die Bakterienkonzentration in den einzelnen Gefäßen nicht konstant genug gewesen sein, hinzu kommt noch, dass bei stattgefundenener Transduktion Phagen auch lytisch wirksam werden können, was zu einer verminderten Zahl an Bakterien führen hätte können und damit manche Kammern nicht mit ausreichend bakteriellem Material versorgt worden wären. Herstellerkonform wäre die Verwendung von Kolonien, die von festen Nährböden abgenommen werden. Allerdings wurde der Kontrollstamm ATCC 14028 WT im System mittels Kolonie-Abnahme überprüft und erklärt nicht das konstant Urease-positive Ergebnis. Laut Gebrauchsanweisung sind Kulturen von selektiven und nicht selektiven Nährböden möglich. Auch ein Fehler durch Mischkultur ist nicht anzunehmen, da wir in unserer Arbeit Reinkulturen verwendet haben, ebenso war bekannt mit welchem Bakterium inokuliert wurde.

Die Infektion mit temperenten Phagen hatte in diesem Versuch in seltenen Fällen Einfluss auf die essentiellen metabolischen Eigenschaften zur Identifizierung des Bakteriums. Allerdings waren die Veränderungen meist nicht konstant und konnten bei Durchführung im Makroformat nicht wiederholt werden. Das spricht dafür, dass eine zufällige Transduktion selten zu metabolischen Stoffwechseländerungen, die auch zur Identifizierung des Bakteriums herangezogen werden, führt. Eine Phagentransduktion, die zur Produktion von Acetoin führte, zeigte allerdings auch bei einer Wiederholung eine Beeinflussung des Stoffwechsels. Hierfür könnte eine gerichtete Transduktion, zum Beispiel aufgrund einer homologen Rekombination, verantwortlich sein. Dies wäre durch (Teil-)Sequenzierung des Transduzenten und des Phagen nachzuweisen.

Nach einer Phageninfektion können Stoffwechselwege adaptiert, umgeleitet, gesteigert oder vermindert werden. Bei der Betrachtung intrazellulärer Metabolite bei *Pseudomonas aeruginosa* nach einer Infektion mit verschiedenen lytischen Phagen, fiel auf, dass hier je nach Phage unterschiedliche Metabolite gesteigert oder vermindert produziert wurden, auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten, während eine generalisierte Antwort ausblieb (De Smet et al. 2016). Stoffwechseländerungen sind stark von der Gen-Ausstattung der infizierenden Phagen abhängig, können also zu erheblichen Unterschieden führen, so ist nicht vorhersagbar, ob und welche Eigenschaften sich ändern. Allerdings wären kurzfristige, nicht bleibende Veränderungen im Zuge des lytischen Zyklus bei einer Phageninfektion für den Wirtsstoffwechsel und die Diagnostik von untergeordneter Bedeutung.

Auch ist zu erwähnen, dass in dieser Arbeit nur eine ja/nein Antwort möglich war, im Sinne von positiv oder negativ. Auswirkungen wie eine Verstärkung oder Abschwächung von Stoffwechselwegen und -leistungen, also über die Qualität der Reaktion, ließen sich nicht beurteilen.

Bei unserer Betrachtung wurden die Auswirkungen von Phageninfektionen auf einen phagenfreien Stamm herangezogen. Wie es sich umgekehrt auf den Stoffwechsel von Bakterienstämmen auswirkt, die als Wildtyp Bakteriophagen beinhalten, wenn man eben diese induziert und somit einen phagenfreien Stamm generiert, wäre auch ein Aspekt. Bei Sulfat-reduzierenden Bakterien zeigte sich in ebenso einem Versuch ein signifikanter

Unterschied in der Nutzung von Kohlenstoffquellen und bei der Transformation von Eisen (Balarjishvili et al. 2021). Hingegen konnte bei *Corynebacterium glutamicum* nach Entfernung der drei Phagen die normalerweise im Genom enthalten sind keine signifikanten Unterschiede in seiner Stoffwechselleistung im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Baumgart et al. 2013).

Was die Anzahl der in einem Bakterium vorkommenden Phagen betrifft, so tragen natürlich vorkommende Salmonellen mehrere Prophagen in ihrem Genom (Kropinski et al. 2007). In dieser Arbeit wurde stets nur gesamtes Phagenlysat zur Infektion herangezogen. Die Anzahl könnte neben der Art auch noch ein Faktor sein der zu berücksichtigen wäre, auch im Hinblick des Potentials von bestimmten *S. Typhimurium* Phagen mit anderen Phagen durch Rekombination veränderte Phagen hervorzubringen (Yamamoto 1968). Ob hier das Serovar auch eine Rolle spielt, kann nicht gesagt werden, weil nur zwei Phagenlysate von einem anderen Serovar, nämlich *S. Enteritidis*, stammten. Alle anderen 38 waren Phagen verschiedener *S. Typhimurium* Stämme. Hier bleibt allerdings zu berücksichtigen, dass Phagen meist unterschiedliche Spezifität aufweisen und nicht jeder Phage jeden Serovar, oder jeden Stamm infizieren kann (Kropinski et al. 2007). Bei den von uns verwendeten Phagen war schon im Vorfeld bekannt, dass sie den Teststamm als Wirt nutzen konnten. Allerdings stammte die einzige Probe, die keinen Unterschied zu den Reaktionen der prophagenfreien Referenz aufwies, von einem *S. Enteritidis* Stamm, was darauf hindeuten könnte, dass hier keine Infektion stattgefunden hat.

Ein weiterer Aspekt ist, dass unsere Überprüfung unter Laborbedingungen stattgefunden hat. Viele der kurz nach der Phageninfektion gebildeten kleinen Proteine haben korrespondierende Gene, die gelöscht werden können, ohne dass es zu einem Effekt auf die Phagen-Produktion kommt, wodurch die Vermutung besteht, dass sie nur unter spezifischen Umgebungsbedingungen eine Rolle spielen oder bei der Infektion bestimmter Wirte (Roucourt und Lavigne 2009). Auch der *S. Typhimurium* Phage P22 wirkt sich auf die *dgo*-Gene, die für den Metabolismus von D-Galactonat wichtig sind, nur im Zustand der Pseudolysogenie aus (Cenens et al. 2013), ein Zustand, der vor allem bei schlechter Nährstoffsituation auftreten kann, was darauf hindeutet, dass andere Bedingungen eine Rolle

spielen. Ob sich das dann auch auf essentielle Eigenschaften auswirken könnte, kann man nicht vorhersagen.

Die im Versuch verwendeten Phagen stammten von Bakterien ohne veränderte biochemische Eigenschaften. Da Phagen aber nicht nur das Potential haben Eigenschaften zu verändern, sondern auch das Potential besitzen bereits vorhandene Eigenschaften zu übertragen, wie etwa bei Antibiotkaresistenzgenen (Shousha et al. 2015) oder Toxingenen (Wagner und Waldor 2002), wäre eine Überprüfung der Übertragbarkeit von Bakterienstämmen mit veränderten Eigenschaften auf Bakterien ohne veränderte Eigenschaften auch noch ein Punkt, der Beachtung finden sollte.

Auch wenn sich in dieser Arbeit selten Auswirkungen einer Phageninfektion auf essentielle Eigenschaften, die zur Identifizierung von *S. Typhimurium* genutzt werden, zeigen ließen, so ist nicht auszuschließen, dass unter Bedingungen limitierten Nährstoffgehaltes, diese häufiger auftreten könnten. Metabolische Eigenschaften sind oft komplex organisiert, mit mehreren beteiligten Genen und Enzymen. Im Gegenzug dazu werden Phagen ins Wirtsgenom eingebaut und können auf unterschiedlichste Weise wirken (Lysogene Konversion oder auch komplexer) (Feiner et al. 2015, Brüssow et al. 2004). *S. Typhimurium* kann in seinem Genom wiederum verschiedene Phagen tragen (Kropinski et al. 2007), deren Funktionen bei weitem noch nicht alle bekannt sind. Außerdem handelt es sich um einen Erreger, der enorme Anpassungsfähigkeit besitzt. Er muss im Zuge von Überleben, Ausbreitung und Infektion mit den unterschiedlichsten Umgebungsbedingungen, wie Überleben außerhalb des Wirtes, extrazelluläres Überleben im Magen-Darm-Trakt bis hin zum intrazellulären Dasein mit den damit einhergehenden großen Unterschieden wie Nährstoffverfügbarkeit, pH, Abwehr des Wirts und konkurrierende Bakterienspezies zurechtkommen. Dass veränderte Stämme bei Salmonellen im Allgemeinen und diesem Serovar im Speziellen beschrieben sind, wundert deshalb nicht. Da beschriebene atypische Salmonellenstämme sich unter veränderten Umgebungsbedingungen finden, besteht hier die Theorie dass sie sich im Zuge einer Anpassung auf einen Selektionsdruck gebildet haben: so werden zum Beispiel bei Lactose-fermentierenden Salmonellen eine Anpassung an ein reichlich vorhandenes Substrat (McDonough et al. 2000, Leonard et al. 2015), bei H₂S-negativen Stämmen ein möglicher Vorteil gegenüber anderen Bakterien im Darm gemeinsam mit einer Reaktion auf häufig

eingesetzte Mikrobiozide wie Kupfer vermutet (Mourao et al. 2020, Sakano et al. 2013). Bei Laktose-fermentierenden Salmonellen zeigten Leonard et al. (2015) dass der Erwerb dieser Eigenschaft nicht einheitlich stattgefunden hat, Gene dafür waren sowohl auf Plasmiden, als auch chromosomal zu finden (Leonard et al. 2015). Bei H₂S-negativen Salmonellen fanden sich verschiedene Mutationen in Genen die für diese Stoffwechseleigenschaft essentiell sind (Xie et al. 2015 und 2018, Yi et al. 2014, Mourao et al. 2020, Sakano et al. 2013). Auch neue metabolische Eigenschaften werden also auf verschiedenen Wegen übernommen, dass Phagen hier auch einen Beitrag geleistet haben, ist nicht undenkbar, sind sie doch auch an der Evolution der Bakterien beteiligt (Wahl et al. 2019).

Nachdem die konventionelle Salmonellendiagnostik sich stark auf spezifische biochemische Eigenschaften stützt, können sich Änderungen hier ungünstig auswirken. Die Gefahr besteht dass Krankheitserreger nicht detektiert werden, dadurch auch nicht bekämpft und sich schließlich ausbreiten und endemisch werden (McDonough et al. 2000). Auch nicht zu vernachlässigen ist, dass einige solche Stämme durchaus in mehr als einer Eigenschaft verändert sein können, wie bei den H₂S-negativen Salmonellen, die eine erhöhte Metalltoleranz und Antibiotkaresistenzen aufwiesen (Sakano et al. 2013) - eine Kombination aus schwer zu detektierenden und zusätzlich noch resistenten Isolaten sollte unbedingt vermieden werden.

Inwieweit hier Phagen eine Rolle zukommt, interessiert nicht zuletzt unter dem Aspekt, dass die Anwendung von Phagen in der Lebensmittelherstellung ein aktuelles Thema ist. Vergessen werden sollte hier auch nicht, dass solche Phagen-Präparate im Allgemeinen nur die Keimzahl senken, sie aber nicht komplett eliminieren (Vikram et al. 2021). Es sollen nur rein lytische Phagen zur Anwendung kommen, die als unbedenklich gelten, aber auch gegen lytische Phagen können Bakterien resistent werden (Lewis und Hill 2020) und es gibt einfach noch wenig Wissen über eventuelle Interferenzen und deren Auswirkungen auf ihre Wirte. Interaktionen mit im Genom befindlichen Prophagen und Effekte daraus sind nicht vorherzusagen (Wahl et al. 2019). Ob und wie sich Phageninfektionen auf die Stoffwechseleigenschaften ihrer Wirte auswirken, mag von untergeordneter Bedeutung erscheinen, größere Sorge machen sicher Ausbildung und Weitergabe von Antibiotkaresistenzen und pathogenen Eigenschaften. Jedoch sind die Eigenschaften für die

Diagnostik essentiell und veränderte Eigenschaften bedeuten auch eine Erschließung neuer Ressourcen. Es ist daher wichtig das Potential von Phagen möglichst gering zu halten, um nicht die Evolution von Phagen und Salmonellen voranzutreiben.

6. Zusammenfassung

Bakteriophagen können in der Evolution der Bakterien eine wichtige Rolle spielen. Durch den Einbau der Phagen-DNA ins bakterielle Genom sind sie in der Lage ihrem Wirtsbakterium auf vielfältigen Wegen neue Eigenschaften zu verleihen, wobei über den Beitrag von Bakteriophagen zur Pathogenität ihrer Wirte bereits zahlreiche Arbeiten vorliegen. Im Zuge der Infektion kommt es zur Adaption des bakteriellen Stoffwechsels, was sich in Anpassung und Umleitung der Stoffwechselwege auswirkt. Ob und wie häufig sich eine Phageninfektion auf die biochemischen Eigenschaften eines *Salmonella* Typhimurium Stammes auswirkt, die auch zur Speziesdiagnostik herangezogen werden, wurde in dieser Arbeit untersucht. Hierfür wurde ein *S. Typhimurium* Stamm mit 40 verschiedenen Phagen transduziert. 15 relevante biochemische Eigenschaften wurden danach mittels kommerziellem Multitestsystem (EnteroPluri-Test) überprüft. Neun Eigenschaften entsprachen bei allen 40 Phagen-transduzierten Proben stets dem als Referenz mitgeführten phagenfreien Referenzstamm WT 14028 und waren somit unverändert. Abweichungen gab es im Multitestsystem bei sechs Eigenschaften. Zwei davon, Citrat-Verwertung und Urease-Aktivität, wurden für alle 40 auf konventionellen Nährböden überprüft, auf denen sich kein Unterschied zur phagenfreien Referenz darstellen ließ. Die Lysin-Decarboxylierung, bei der es bei fünf Proben Abweichungen im Multitestsystem gab, wurde auf Lysin-Decarboxylase-Agar überprüft, auch sie entsprachen der phagenfreien Referenz und waren somit unverändert. Einmalige Veränderungen bei Gas-Bildung aus Glucose und H₂S-Bildung waren in einem zweiten Testdurchgang mittels EnteroPluri-Test nicht reproduzierbar. Veränderte VP-Reaktionen, die sich bei drei Proben zeigten, waren in einem zweiten Test-Durchgang mittels EnteroPluri-Test für zwei nicht reproduzierbar, nur eine wies weiterhin eine positive Reaktion auf, die von WT 14028 abwich. Von 40 auf 15 verschiedene Eigenschaften getesteten Proben gab es bei einer Probe wiederholt eine Veränderung des Stoffwechsels. Es ist nicht davon auszugehen, dass hier ein Problem mit dem Testsystem vorlag, da dies einer Chargenkontrolle unterliegt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Phageninfektion sich selten auf die biochemischen Eigenschaften, die zur Diagnostik herangezogen werden auswirkt.

6.1 Abstract

Bacteriophages are known to play an important part in bacterial evolution. Implementation of phage-DNA in the bacterial genome may result in new abilities for the bacterial host. Several studies show the impact of phages on the pathogenicity to their bacterial host. By phage-infection, the host adapts, resulting in redirecting the host's metabolic pathways. If and how often a phage-infection of a *Salmonella* Typhimurium strain may affect biochemical properties, used in species diagnostic was under study. A *Salmonella* Typhimurium strain (WT 14028) was transduced with 40 different phage lysates. Biochemical properties, relevant to species diagnostic, were tested using a commercial multitestsystem (Enteropluri-Test). Nine characteristics were unaltered in all 40 samples, showing same results as phagefree reference WT 14028. Six reactions, citrate-utilization, urease-activity, lysine-decarboxylation, gas-production from glucose-fermentation, H₂S-production and VP-reaction (Acetoin-production) changed after transduction. To study reproducibility/directed transduction, altered samples were tested again on commercial multitestsystem and macro-assays on conventional prepared agar were used. Results for citrate utilization, urease activity, lysine-decarboxylation, gas-production from glucose-fermentation and H₂S-production were not reproducible/directed. Production of acetoin and diacetyl (VP-reaction) by one phage lysate was reproducible and thus might be a directed phage transduction. For all 40 phage lysates tested for 15 characteristics, there was only one reaction resulting in a reproducible change. It is ruled out that this change could be based on the testsystem based on batch controls used.

In this work we could show that phage transduction may in rare cases change biochemical characteristics, used for species diagnostic.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AMGs	Auxiliary Metabolic Genes
Aqua bidest	Aqua bidestillata
ATCC	American Type culture collection
BHI	Brain Heart Infusion Agar
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
g/l	Gramm pro Liter
g	Gramm
GOS	Global Ocean Survey
H ₂ S	Dihydrogensulfid
KOH	Kaliumhydroxid
LB	lysogenic broth
LPS	Lipopolysaccharid
ml	Milliliter
MMR	Mismatch/Repair
MR	Methylrot
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NH ₃	Ammoniak
PA	Phenylalanin
PES	Polyethersulfon
PFU/ml	Plaque forming units per mililitre
rpm	rounds per minute
S ₃ O ₃ ²⁻	Thiosulfat
SPI	Salmonella pathogenic island
spp.	spezies
spv	Salmonella plasmid virulence

Stx	Shigatoxin
TSI	Triple Sugar Iron
VP	Voges-Proskauer
WT	Wildtyp
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat

8. Literaturverzeichnis

AGES. <http://www.ages.at/themen/krankheitserreger/salmonellen> (Zugriff 9.7.2021).

American Society for Microbiology. <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Citrate-Test-Protocol.pdf?ext=.pdf> (Zugriff 20.4.2022).

American Society for Microbiology. <https://asm.org/getattachment/200d3f34-c75e-4072-a7e6-df912c792f62/indole-test-protocol-3202.pdf> (Zugriff 20.4.2022).

American Society for Microbiology. <https://asm.org/getattachment/ac4fe214-106d-407c-b6c6-e3bb49ac6ffb/urease-test-protocol-3223.pdf> (Zugriff 20.4.2022).

Argov T, Azulay G, Pasechnek A, Stadnyuk O, Ran-Sapir S, Borovok I, Sigal N, Herskovits AA. 2017. Temperate bacteriophages as regulators of host behaviour. *Curr Opin Microbiol*, 38: 81-87. DOI 10.1016/j.mib.2017.05.002 (Zugriff 10.4.2022).

Balarjishvili N, Kvachadze L, Tevdoradze E, Skhirtladze N, Leshkasheli L, Bolkvadze D, Pataridze T, Meskhi T, Chakraborty R, Kutateladze M, Torok T. 2021. Significance of lysogeny for the metabolism of *Desulfovibrio* spp. strains isolated from aquatic environments of Georgia. *J Appl Microbiol* 131 (3): 1344-1359. DOI 10.1111/jam.15030 (Zugriff 10.4.2022).

Baumgart M, Unthan S, Rückert C, Sivalingam J, Grünberger A, Kalinowski J, Bott M, Noack S, Frunzke J. 2013. Construction of a prophage-free variant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 for use as a platform strain for basic research and industrial biotechnology. *Appl Environ Microbiol* 79 (19): 6006-15. DOI 10.1128/AEM.01634-13 (Zugriff 10.4.2022).

Berger P, Kouzel IU, Berger M, Haarmann N, Dobrindt U, Koudelka GB, Mellmann A. 2019. Carriage of Shiga toxin phage profoundly affects *Escherichia coli* gene expression and carbon source utilization. *BMC Genomics* 20 (1): 504. DOI 10.1186/s12864-019-5892-x (Zugriff 10.4.2022).

Brüssow H, Canchaya C, Hardt WD. 2004. Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangement to Lysogenic Conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* 68 (3): 560–602. DOI 10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004 (Zugriff 10.4.2022).

Cenens W, Mebrhatu MT, Makumi A, Ceyssens P-J, Lavigne R, Van Houdt R, Taddei F, Aertsen A. 2013. Expression of a Novel P22 ORFan Gene Reveals the Phage Carrier State in *Salmonella* Typhimurium. *PLoS Genet* 9 (2): e1003269. DOI 10.1371/journal.pgen.1003269 (Zugriff 10.4.2022).

Chen Y, Golding I, Sawai S, Guo L, Cox EC. 2005. Population fitness and the regulation of *Escherichia coli* genes by bacterial viruses. *PLoS Biol* 3 (7): e229. DOI 10.1371/journal.pbio.0030229 (Zugriff 10.4.2022).

Chen Y, Yang L, Yang D, Song J, Wang C, Sun E, Gu C, Chen H, Tong Y, Tao P, Wu B. 2020. Specific Integration of Temperate Phage Decreases the Pathogenicity of Host Bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 10 (14). DOI 10.3389/fcimb.2020.00014 (Zugriff 12.4.2022).

Colombe S, Jernberg C, Löf E, Lindqvist Angervall A, Meilström-Dahlgren H, Dotevall L, Bengner M, Hall I, Sundqvist L, Kühlmann-Berenzon S, Galanis I, Lindblad M, Hansen A, Rehn M. 2019. Outbreak of unusual H2S-negative monophasic *Salmonella* Typhimurium strain likely associated with small tomatoes, Sweden, August to October 2019. *Euro Surveill* 24 (47): 1900643. DOI 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.47.1900643 (Zugriff 12.4.2022).

Dandekar T, Fieselman A, Fischer E, Popp J, Hensel M, Noster J. 2015. *Salmonella*-how a metabolic generalist adopts an intracellular lifestyle during infection. *Front Cell Infect Microbiol* 4 (24): 191. DOI 10.3389/fcimb.2014.00191 (Zugriff 12.4.2022).

Davies EV, James CE, Williams D, O'Brien S, Fothergill JL, Haldenby S, Paterson S, Winstanley C, Brockhurst MA. 2016. Temperate phages both mediate and drive adaptive evolution in pathogen biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (29): 8266-8271. DOI 10.1073/pnas.1520056113 (Zugriff 10.4.2022).

De Smet J, Zimmermann M, Kogadeeva M, Ceyssens P-J, Vermaelen W, Blasdel B, Jang H B, Sauer U, Lavigne R. 2016. High coverage metabolomics analysis reveals phage-specific

alterations to *Pseudomonas aeruginosa* physiology during infection. The ISME J 10: 1823-1835. DOI 10.1038/ismej.2016.3 (Zugriff 10.4.2022).

Dube SD. 1982. Outbreak of Food Poisoning Caused by Lactose-Fermenting *Salmonella tuebingen*. J Clin Microbiol 17 (4): 698-699. DOI 10.1128/jcm.17.4.698-699.1983 (Zugriff 12.4.2022).

Enav H, Mandel-Gutfreund Y, Béjà O. 2014. Comparative metagenomic analyses reveal viral-induced shifts of host metabolism towards nucleotide biosynthesis. Microbiome 2: 9. DOI 10.1186/2049-2618-2-9 (Zugriff 12.4.2022).

Endersen L, Coffey A. 2020. The use of bacteriophages for food safety. Curr Opin Food Sci 36: 1-8. DOI 10.1016/j.cofs.2020.10.006 (Zugriff 20.3.2021).

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA J 19 (2): 6406. DOI 10.2903/j.efsa.2021.6406 (Zugriff 12.10.2021).

Falcao DP, Trabulsi LR, Hicksman FW, Farmer III JJ. 1975. Unusual *Enterobacteriaceae*: Lactose-Positive *Salmonella typhimurium* Which is Endemic in Sao Paulo, Brazil. J Clin Microbiol 2 (4): 349-353. DOI 10.1128/jcm.2.4.349-353.1975. (Zugriff 17.4.2022).

Fang FC, DeGroote MA, Foster JW, Bäumlér AJ, Ochsner U, Testerman T, Bearson S, Giard J-C, Xu Y, Campbell G, Laessig T. 1999. Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmatic Cu, Zn-superoxide dismutases. Proc Natl Acad Sci U S A 96 (13):7502-7507. DOI 10.1073/pnas.96.13.7502 (Zugriff 17.4.2022).

Farmer III JJ, McWorther AC, Huntley GA, Catignagni J. 1975. Unusual *Enterobacteriaceae*: a *Salmonella cubana* that is Urease Positive. J Clin Microbiol 1 (1): 106-107. DOI 10.1128/jcm.1.1.106-107.1975 (Zugriff 17.4.2022).

Feiner R, Argov T, Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, Herskovits A. 2015. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. Nat Rev Microbiol 13: 641-650. DOI 10.1038/nrmicro3527 (Zugriff 20.3.2022).

- Fierer J, Guiney DG. 2001. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest* 107 (7): 775-780. DOI 10.1172/JCI12561 (Zugriff 20.3.2022).
- Figuera-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D, Bossi L. 2001. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol* 39 (2): 260-71. DOI 10.1046/j.1365-2958.2001.02234.x (Zugriff 12.4.2022).
- Fokine A, Rossmann MG. 2014. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage* 4: e28281. DOI 10.4161/bact.28281 (Zugriff 12.4.2022).
- Fuchs G, Hrsg. 2014. Allgemeine Mikrobiologie. Neunte Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 112-137, 184-201, 425-428.
- Garcia P, Martinez B, Obeso JM, Rodriguez A. 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett Appl Microbiol* 47 (6): 479-485. DOI 10.1111/j.1472-765X.2008.02458.x (Zugriff 10.3.2022).
- Garibaldi JA, Bayne HG. 1970. Production of Acetoin and Diacetyl by the Genus *Salmonella*. *Appl Microbiol* 20 (6): 855-856. DOI 10.1128/am.20.6.855-856.1970 (Zugriff 3.4.2022).
- Gerlach RG, Hensel M. 2007. *Salmonella* Pathogenicity Islands in host specificity, host pathogen-interactions and antibiotics resistance of *Salmonella enterica*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 120 (7-8): 317-327. DOI 10.2376/0005-9366-120-317 (Zugriff 13.4.2022).
- Gong C, Jiang X. 2017. Application of bacteriophages to reduce *Salmonella* attachment and biofilms on hard surfaces. *Poult Sci* 96 (6): 1838-1848. DOI 10.3382/ps/pew463 (Zugriff 7.3.2022).
- Hagens S, Loessner MJ. 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 76 (3): 513-519. DOI 10.1007/s00253-007-1031-8 (Zugriff 7.3.2022).
- Hargreaves KR, Kropinski AM, Clokie MRJ. 2014. Bacteriophage behavioral ecology How phages alter their bacterial host's habits. *Bacteriophage* 4 (3): e29866. DOI 10.4161/bact.29866 (Zugriff 12.4.2022).

Hayek LJ, Willis GW. 1984. Identification of the Enterobacteriaceae: a comparison of the Enterotube II with the API 20E. J Clin Pathol 37 (3): 344-347. DOI 10.1136/jcp.37.3.344 (Zugriff 10.3.2022).

Ho TD, Figuera-Bossi N, Wang M, Uzzau S, Bossi L, Slauch JM. 2002. Identification of GtgE, a novel virulence factor encoded on the Gifsy-2 bacteriophage of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Bacteriol 184 (19): 5234-5239. DOI 10.1128/JB.184.19.5234-5239.2002 (Zugriff 10.3.2022).

Holmes B. 1989. Comparative Evaluation of the Roche Cobas IDA and Enterotube II Systems for Identifying Members of the Family *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 27 (5): 1027-1030. DOI 10.1128/jcm.27.5.1027-1030.1989 (Zugriff 3.4.2022).

ISO (2017). ISO 6579-2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of salmonella spp. Geneva, Switzerland: International Organization of Standardization.

Jajere SM. 2019. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. Vet World 12 (4): 504-521. DOI 10.14202/vetworld.2019.504-521 (Zugriff 3.4.2022).

Krieg NR, Holt JG, Hrsg. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, volume 1. Erste Aufl. Baltimore, USA: Williams and Wilkins, 408-411, 415-416, 427-429.

Kropinski AM, Sulakvelidze A, Konczy P, Poppe C. 2007. *Salmonella* Phages and Prophages-Genomics and Practical Aspects. Methods Mol Biol 394: 133-175. DOI 10.1007/978-1-59745-512-1_9 (Zugriff 17.3.2022).

Lee K-M, Runyon M, Herrman TJ, Phillips TJ, Hsieh J. 2015. Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emerging response and food safety. Food Control 47: 264-276. DOI 10.1016/j.foodcont.2014.07.011 (Zugriff 12.4.2022).

Leonard SR, Lacher DW, Lampel KA. 2015. Acquisition of the lac operon by *Salmonella enterica*. BMC Microbiol 15 (1): 173. DOI 10.1186/s12866-015-0511-8 (Zugriff 20.4.2022).

Lewis R, Hill C. 2020. Overcoming barriers to phage application in food and feed. *Curr Opin Biotechnol* 61: 38-44. DOI 10.1016/j.copbio.2019.09.018 (Zugriff 10.4.2022).

McDonough PL, Shin SJ, Lein DH. 2000. Diagnostic and Public Health Dilemma of Lactose-Fermenting *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium in Cattle in the Northeastern United States. *J Clin Microbiol* 38 (3): 1221-1226. DOI 10.1128/JCM.38.3.1221-1226.2000 (Zugriff 10.4.2022).

Mibius e.K-Fachhandel für das mikrobiologische Labor.

<https://www.mibius.de/index.php?sid=x&shp=oxbaseshop&cl=details&anid=7a946d67a71432823.22896970> (Zugriff 20.4.2022).

Morita M, Mori K, Tominaga K, Terajima J, Hirose K, Watanabe H, Izumiya H. 2006. Characterization of lysine decarboxylase-negative strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis disseminated in Japan. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46 (3): 381-385. DOI 10.1111/j.1574-695X.2006.00043.x (Zugriff 20.4.2022).

Mourao J, Rebelo A, Ribeiro S, Peixe L, Novais C, Antunes P. 2020. Atypical Non-H₂S-Producing Monophasic *Salmonella* Typhimurium ST3478 Strains from Chicken Meat at Processing Stage Are Adapted to Diverse Stresses. *Pathogens* 9 (9): 701. DOI 10.3390/pathogens9090701 (Zugriff 20.4.2022).

Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE, Hrsg. 2005. *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology, volume 1. Zweite Aufl. Washington, DC: ASM Press, 244, 307-311, 317-318, 323-326, 367, 388, 412, 1440, 1542-1543.

Nolle N, Felsl A, Heermann R, Fuchs TM. 2017. Genetic Characterization of the Galactitol Utilization Pathway of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 199 (4): e00595-16. DOI 10.1128/JB.00595-16 (Zugriff 20.4.2022).

Pasechnek A, Rabinovich L, Stadnyuk O, Azulay G, Mioduser J, Argov T, Borovok I, Sigal N, Herskovits AA. 2020. Active Lysogeny in *Listeria Monocytogenes* Is a Bacteria-Phage Adaptive Response in the Mammalian Environment. *Cell Rep* 32 (4): 107956. DOI 10.1016/j.celrep.2020.107956 (Zugriff 10.4.2022).

- Rabsch W, Andrews HL, Kingsley RA, Prager R, Tschäpe H, Adams LG, Bäumler AJ. 2002. *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium and Its Host-Adapted Variants. *Infect Imm* 70(5): 2249-2255. DOI 10.1128/IAI.70.5.2249-2255.2002 (Zugriff 10.4.2022).
- Roucourt B, Lavigne R (2009). The role of interactions between phage and bacterial proteins within the infected cell: a diverse and puzzling interactome. *Environ Microbiol* 11(11) 2789-2805. DOI 10.1111/j.1462-2920.2009.02029.x (Zugriff 10.4.2022).
- Sabbagh SC, Forest CG, Lepage C, Leclerc J-M, Daigle F. 2010. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett* 305 (1): 1-13. DOI 10.1111/j.1574-6968.2010.01904.x (Zugriff 12.4.2022).
- Sakano C, Kuroda M, Sekizuka T, Ishioka T, Morita Y, Ryo A, Tsukagoshi H, Kawai Y, Inoue N, Takada H, Ogaswara Y, Nishina A, Shimoda M, Kozawa K, Oishi K, Kimura H. 2013. Genetic Analysis of Non-Hydrogen Sulfide- Producing *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Serovar Infantis Isolates in Japan. *J Clin Microbiol* 51 (1): 328-330. DOI 10.1128/JCM.02225-12 (Zugriff 6.4.2022).
- Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. 2012. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol* 7 (10): 1147-1171. DOI 10.2217/fmb.12.97 (Zugriff 6.1.2022).
- Schuch R, Fischetti VA. 2009. The secret life of the Anthrax Agent *Bacillus anthracis*: Bacteriophage-Mediated Ecological Adaptations. *PLoS One* 4 (8): e6532. DOI 10.1371/journal.pone.0006532 (Zugriff 3.9.2021).
- Scott J, Thompson-Mayberry P, Lahmamsi S, King CJ, McShan WM. 2008. Phage-associated mutator phenotype in group A streptococcus. *J Bacteriol* 190 (19): 6290-6301. DOI 10.1128/JB.01569-07 (Zugriff 20.4.2022).
- Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. 2015. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Zehnte, aktualisierte Aufl. Stuttgart: Enke Verlag, 65-75, 90, 121-122, 190-191, 203-207.

Shayegani M, Maupin PS, McGlynn DM. 1978. Evaluation of the API 20E system for identification of nonfermentative Gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 7 (6): 539-545. DOI 10.1128/jcm.7.6.539-545.1978 (Zugriff 3.4.2022).

Shousha A, Awaiwanont N, Sofka D, Smulders FJM, Paulsen P, Szostak MP, Humphrey T, Hilbert F. 2015. Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes. *Appl Environ Microbiol* 81 (14): 4600-4606. DOI 10.1128/AEM.00872-15 (Zugriff 6.9.2021).

Sillankorva SM, Oliveira H, Azeredo J. 2012. Bacteriophages and Their Role in Food Safety. *Int J Microbiol* 2012 (1): 863945. DOI 10.1155/2012/863945 (Zugriff 20.4.2022).

Spanier JG, Cleary PP. 1980. Bacteriophage control of antiphagocytic determinants in group A Streptococci. *J Exp Med* 152 (5): 1393-406. DOI 10.1084/jem.152.5.1393 (Zugriff 6.9.2022).

Srikanth CV, Mercado-Lubo R, Hallstrom K, McCormick BA. 2011. Salmonella effector proteins and host-cell responses. *Cell Mol Life Sci* 68 (22): 3687-3697. DOI 10.1007/s00018-011-0841-0 (Zugriff 2.11.2021).

Taylor SJ, Winter SE. 2020. Salmonella finds a way: Metabolic versatility of Salmonella enterica serovar Typhimurium in diverse host environments. *PLoS Pathog* 16 (6): e1008540. DOI 10.1371/journal.ppat.1008540 (Zugriff 20.4.2022).

Thermo Fisher Scientific Inc.

http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0155&c=UK&lang=EN (Zugriff 20.4.2022).

Thermo Fisher Scientific Inc.

http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0308&c=UK&lang=EN (Zugriff 20.4.2022).

Thomforde KM, Rhoden DL, Smith PB, Balows A. 1973. Evaluation of the Redesigned Enterotube-a System for the Identification of *Enterobacteriaceae*. *Appl Microbiol* 25 (2): 301-304. DOI 10.1128/am.25.2.301-304.1973 (Zugriff 3.4.2022).

- Thompson LR, Zeng Q, Kelly L, Huang KH, Singer AU, Stubbe J, Chisholm SW. 2011. Phage auxiliary metabolic genes and the redirection of cyanobacterial host carbon metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (39): E757-E764. DOI 10.1073/pnas.1102164108 (Zugriff 10.4.2022).
- Tinsley CR, Bille E, Nassif X. 2006. Bacteriophages and pathogenicity: more than just providing a toxin. *Microbes Infect* 8: 1365-1371. DOI 10.1016/j.micinf.2005.12.013 (Zugriff 7.9.2021).
- Viala JP, Méresse S, Pocachard B, Guilhon AA, Aussel L, Barras F. 2011. Sensing and adaptation to low pH mediated by inducible amino acid decarboxylases in *Salmonella*. *PLoS One* 6 (7): e22397. DOI 10.1371/journal.pone.0022397 (Zugriff 20.4.2022).
- Vikram A, Woolston J, Sulakvelidze A. 2021. Phage Biocontrol Applications in Food Production and Processing. *Curr Issues Mol Biol* 40: 267-302. DOI 10.21775/cimb.040.267 (Zugriff 20.4.2022).
- Wagner PL, Waldor MK. 2002. Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect Immun* 70 (8): 3985-3993. DOI 10.1128/IAI.70.8.3985-3993.2002 (Zugriff 9.10.2021).
- Wahl A, Battesti A, Ansaldi M. 2019. Prophages in *Salmonella enterica*: a driving force in reshaping the genome and physiology of their bacterial host. *Mol Microbiol* 111 (2): 303-316. DOI 10.1111/mmi.14167 (Zugriff 7.4.2022).
- Wienhold S-M, Lienau J, Witzentrath M. 2019. Towards Inhaled Phage Therapy in Western Europe. *Viruses* 11 (3): 295. DOI 10.3390/v11030295 (Zugriff 3.11.2021).
- Xie J, Yi S, Zhu J, Li P, Liang B, Li H, Yang X, Wang L, Hao R, Jia L, Wu Z, Qiu S, Song H. 2015. Antimicrobial Resistance and Molecular Investigation of H₂S-Negative *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Choleraesuis Isolates in China. *PLOS ONE* 10 (10): e0139115. DOI 10.1371/journal.pone.0139115 (Zugriff 17.4.2022).
- Xie J, Wu F, Xu X, Yang X, Zhao R, Ma Q, Li P, Wang L, Hao R, Jia L, Du X, Qiu S, Song H. 2018. Antibiotic resistance and molecular characterization of the hydrogen sulfide-

negative phenotype among diverse *Salmonella* serovars in China. *BMC Infect Dis* 18 (1): 292. DOI 10.1186/s12879-018-3209-3 (Zugriff 17.4.2022).

Yamamoto N. 1969. Genetic Evolution of Bacteriophage, I Hybrids between unrelated Bacteriophages P22 and Fels 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 62 (1): 63-69. DOI 10.1073/pnas.62.1.63 (Zugriff 16.4.2022).

Yie S, Xie J, Liu N, Li P, Xu X, Li H, Sun J, Wang J, Liang B, Yang C, Wang X, Hao R, Wang L, Wu Z, Zhang J, Wang Y, Huang L, Sun Y, Klena J D, Meng J, Qiu S, Song H. 2014. Emergence and prevalence of Non-H₂S-Producing *Salmonella enterica* Serovar Senftenberg Isolates Belonging to Novel Sequence Type 1751 in China. *J Clin Microbiol* 52 (7): 2557-2565. DOI 10.1128/JCM.00377-14 (Zugriff 20.4.2022).

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: EnteroPluri-Test von WT 14028	40
Abb. 2: VP-Reaktion	42
Abb. 3: Lysindecaboxylierung	42
Abb. 4: unterschiedliche Citratverwertung.....	43
Abb. 5: unterschiedliche Citratverwertung und Harnstoffhydrolyse verschiedener Proben im EnteroPluri-Test.	45
Abb. 6: Simmons-Citrat-Agar zur Überprüfung der Citratverwertung	48
Abb. 7: Lysindecaboxylase-Agar	49

10. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der biochemischen Reaktionen im EnteroPluri-Test mit Name und Nummer der Kammer	29
Tab. 2: Erscheinungsbild positiver und negativer Reaktionen im EnteroPluri-Test	34
Tab. 3: Übersicht zu erwartende Reaktionen und tatsächliche Reaktionen ATCC 14028.....	39
Tab. 4: Unveränderte biochemische Eigenschaften im EnteroPluri-Test nach Phageninokulation	41
Tab. 5: Veränderte biochemische Eigenschaften im EnteroPluri-Test nach Phageninokulation	41
Tab. 6: Veränderte biochemische Eigenschaften im EnteroPluri-Test nach Anzahl und Art sowie Probenanzahl	44
Tab. 7: Ergebnisse der EnteroPluri-Tests aller Proben.....	46
Tab. 8: Gegenüberstellung der Ergebnisse: Anzahl der Veränderungen im Enteropluri-Test verglichen mit Veränderungen nach einem zweiten Durchgang bzw. nach Test auf speziellem Nährboden.	47