

## Bachelorarbeit

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie  
Arbeitsbereich Bakteriophagen

Fakultät Life Sciences  
Studiendepartment Biotechnologie

**Charakterisierung des temperenten Phagen aus dem  
lysogenen *Bifidobacterium thermophilum* Stamm 94004**

vorgelegt von: Peer Iven Schleifenbaum  
Matrikel-Nr.: XXXXXXXXXX

Ort und Datum: Hamburg, 28. März 2018

Erstgutachter: Prof. Dr. Ernst. A. Sanders (HAW Hamburg)

Zweitgutachterin: Dr. Sabrina Koberg (Max Rubner-Institut)

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VI
1 Einleitung .....	1
1.1 Bifidobakterien .....	1
1.1.1 Eigenschaften .....	1
1.1.2 Bedeutung für den Menschen .....	2
1.1.3 <i>Bifidobacterium thermophilum</i> .....	3
1.2 Probiotik .....	3
1.3 Bakteriophagen .....	3
1.3.1 Allgemeines .....	3
1.3.2 Bakteriophagen der Gattung <i>Bifidobacterium</i> .....	5
2 Zielsetzung .....	6
3 Material und Methoden .....	7
3.1 Geräte, Software und Materialien .....	7
3.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer .....	7
3.3 Mikrobiologischer Umgang mit Bifidobakterien .....	7
3.3.1 Kulturmedien .....	7
3.3.2 Standard-Anzucht .....	9
3.3.3 Anzucht im Hungate-System .....	9
3.3.4 Bestimmung der Lebendkeimzahl .....	9
3.4 Gewinnung von Phagen .....	10
3.4.1 Kultivierung von <i>B. thermophilum</i> 94004 im Bioreaktor .....	10
3.4.2 Phagenaufreinigung mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradienten- Ultrazentrifugation .....	12
3.5 Transmissionselektronenmikroskopie von Phagen .....	13
3.6 Spot-Test: Analyse des Phagen-Wirtsspektrums .....	13
3.7 Genomsequenzierung des <i>B. thermophilum</i> Stammes 94004 und des Phagen .....	14

3.7.1	DNA-Extraktion und Aufreinigung.....	14
3.7.2	Genomsequenzierung mittels ILLUMINA MiSeq und Analysen .....	14
3.8	Prophagen-Induktionsversuche .....	15
3.8.1	... mit Mitomycin C.....	15
3.8.2	... mit UV-Licht .....	15
3.9	Isolierung eines Prophagen-kurierten Klon von <i>B. thermophilum</i> 94004 .....	16
3.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	18
3.10.1	Nachweis von Phagen in Überständen.....	18
3.10.2	Identifikation von <i>B. thermophilum</i> 94004 mittels 16S-rRNA-Sequenzierung.	19
3.10.3	Nachweis von kurierten Klonen (Kolonie PCR).....	19
3.10.4	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	20
4	Ergebnisse .....	21
4.1	Phagenproduktion im Bioreaktor .....	21
4.2	Transmissionselektronenmikroskopie des Bakteriophagen.....	21
4.3	Analyse des Wirtsspektrums des Phagen „Willi“ .....	22
4.4	Genomsequenzierung des <i>B. thermophilum</i> Stammes 94004 und des Phagen.....	23
4.5	Induktionsversuche des Prophagen.....	26
4.6	Isolierungsversuche einer Prophagen-kurierten Variante .....	30
5	Diskussion.....	32
6	Zusammenfassung .....	37
7	Ausblick.....	38
	Literaturverzeichnis .....	VII
	Anhang .....	X
	Eidesstattliche Erklärung .....	VII

# Abkürzungsverzeichnis

attL left attachmentsite

attR right attachmentsite

BLASTn Basic Local Alignment Search Tool für Nucleotide

bp basenpaare

CsCl Cäsiumchlorid

DCU digital control unit

DNA Desoxyribonukleinsäure

HCl Hydrochlorid (Salzsäure)

kb kilobasen

KBE Koloniebildende Einheiten

LKZ Lebendkeimzahl

MFCS Multi-Fermenter-Control-System

MMC Mitomycin C

MRS De Man, Rogosa and Sharpe

NaOH Natriumhydroxid (Natronlauge)

OD optische Dichte

ORF Open Reading Frames, open reading frame

PCR Polymerase chain reaction

PHAST PHAge Search Tool

RAST Rapid Annotation using Subsystems Technology

rH<sub>2</sub>O Reinstwasser

rRNA ribosomale Ribonukleinsäure

SM Saline-Magnesium

TAE TRIS-Acetat-EDTA

TEM Transmissionselektronenmikroskop

TPY tryptone phytone yeast

UV Ultraviolett

V Volt

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der Phagen in die Morphotypen A bis G nach Ackermann (2001).....	4
Abbildung 2: Fließschema zur Isolierung Prophagen-kurierter Klone.....	17
Abbildung 3: Aufnahme der 24 h Kultur des <i>B. thermophilum</i> 94004 im Bioreaktor.....	21
Abbildung 4: TEM-Aufnahme des aktiven Bakteriophagen aus <i>B. thermophilum</i> 94004.....	21
Abbildung 5: Aufnahme der <i>B. adolescentis</i> 94072 Kultur in TPY-Soft-Agar.....	23
Abbildung 6: Graphische Darstellung der BLASTn-Ergebnisse des Contig 14.....	24
Abbildung 7: Tabellarische Ergebnisse der BLASTn-Analyse des Contig 14.....	25
Abbildung 9: Induktionsversuch von <i>B. thermophilum</i> 94004 (0,05 – 0,3 µg ml <sup>-1</sup> MMC) .....	26
Abbildung 10: Induktionsversuch von <i>B. thermophilum</i> 94004 (2 – 5 µg ml <sup>-1</sup> MMC) .....	27
Abbildung 11: Induktionsversuch von <i>B. thermophilum</i> 94004 (3 – 7 µg ml <sup>-1</sup> MMC) .....	28
Abbildung 12: Ergebnisse des Kontrollversuchs zur der MMC-Induktion.....	29
Abbildung 13: Aufnahmen der Elektrophorese-Gele der No-Willi-PCR.....	30
Abbildung 14: Ergebnisse der No-Willi-PCR.....	31
Abbildung 15: Ergebnisse der Tape-Measure-PCR.....	31
Abbildung 16: Aufgezeichnete Parameter der Kultivierung von <i>B. thermophilum</i> 94004 .....	XIV
Abbildung 17: TEM-Aufnahmen von Bakteriophagen verschiedener Gruppen.....	XIV
Abbildung 18: Assemblierte Genomdarstellung des <i>B. thermophilum</i> .....	VII
Abbildung 19: Assemblierte Genomdarstellung des Phagen „Willi“ mit annotierten Genen..	VII
Abbildung 20: Graphische Darstellung des Contig 14 inkl. mittels PHAST.....	VIII

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Medien.....	8
Tabelle 2: Betriebsparameter und Ausstattung des Bioreaktors.....	10
Tabelle 3: Herstellung der CsCl-Lösungen und des Gradienten .....	12
Tabelle 4: PCR-Ansatz zum Nachweis von „Willi“ (Tape-Measure-Gen).....	18
Tabelle 5: PCR-Protokoll zum Nachweis von „Willi“ (Tape-Measure-Gen).....	18
Tabelle 6: Morphologiedaten des Phagen „Willi“ .....	22
Tabelle 7: Ergebnisse der Analyse des Wirtsspektrums von „Willi“ .....	22
Tabelle 8: Ausschnitt der Ergebnisse der BLASTn-Analyse (16S-rRNA).....	23
Tabelle 9: Darstellung der BLASTn-Ergebnisse des Contig 14 .....	24
Tabelle 10: Darstellung der BLASTn-Ergebnisse des sequenzierten Phagengenoms.....	26
Tabelle 11: Start- und End-OD-Werte der Kulturen (0,05 - 0,3 µg ml <sup>-1</sup> ) .....	27
Tabelle 12: Start- und End-OD-Werte der Kulturen (2 - 5 µg ml <sup>-1</sup> ).....	28
Tabelle 13: Start- und End-OD-Werte der Kulturen (3 - 7 µg ml <sup>-1</sup> ).....	29
Tabelle 14: Geräteliste mit Hersteller und Typ/Bezeichnungsangabe.....	X
Tabelle 15: Eingesetzte Software und deren Entwickler. ....	XI
Tabelle 16: Verwendete Materialien und deren Hersteller.....	XI
Tabelle 17: Chemikalienliste mit Herstellerangaben. ....	XII
Tabelle 18: Eingesetzte Puffer und Lösungen mit Zusammensetzung.....	XIII
Tabelle 19: Detaillierte Anleitung der DNA-Extraktion .....	VII

# 1 Einleitung

## 1.1 Bifidobakterien

Bifidobakterien sind seit der Entdeckung von Henry Tissier im Jahr 1900 Gegenstand der mikrobiologischen und seit kurzem auch molekularbiologischen Forschung (Pokusaeva *et al.*, 2011). Heute werden ihnen in vielen Veröffentlichungen probiotische Wirkungen zugesprochen. Dennoch existieren hinsichtlich dieser Einflüsse weiterhin Forschungslücken auf molekularer Ebene. Mittlerweile liegt eine große Menge an veröffentlichten Daten zur genetischen Information von Bifidobakterien vor, jedoch konnten diese bis jetzt nur schwer auf funktionaler Ebene analysiert werden, weil es kaum etablierte Methoden gibt, um diese Bakterien genetisch zugänglich zu machen (Serafini *et al.*, 2012).

### 1.1.1 Eigenschaften

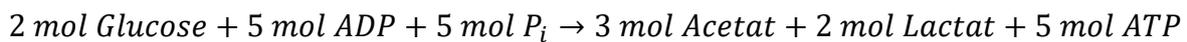
Bifidobakterien sind grampositive, obligat anaerobe Stäbchenbakterien, welche verzweigte Keulenformen aufweisen. Sie können sich weder aktiv bewegen noch Sporen bilden. Am häufigsten finden sie sich in der gesunden Darm-, Vaginal- und Zahnflora bei Menschen und gehören somit zur natürlichen Mikrobiota (Pokusaeva *et al.*, 2011).

Das Genom dieser Bakterien besteht aus einem einzigen zirkulären Chromosom mit einer Größe von durchschnittlich 2,2 Mbp und einem im Vergleich mit anderen grampositiven Bakterien höheren GC-Gehalt von etwa 60 % (Biavati *et al.*, 2001). Die NCBI-Datenbank enthielt 2016 254 Sequenzabschnitte von Bifidobakterien, von denen 61 komplette Genome waren (O' Callahan *et al.*, 2016).

Bis heute (Stand März 2018) sind 65 Spezies der Gattung *Bifidobacterium* benannt und taxonomisch eingeordnet (NCBI Taxonomy Browser). Außerdem gibt es viele Subspezies und nicht klassifizierte Arten. Viele Spezies haben sich in ihrer symbiotischen Umgebung adaptiert und spezielle Enzyme entwickelt. Dadurch können sie eine große Bandbreite an Molekülen zur Energiegewinnung nutzen und schaffen sich einen Vorteil gegenüber kompetitiven Mikroorganismen in der Darmflora (Schell *et al.*, 2002).

Trotz vieler Ähnlichkeiten in Lebensweise und Physiologie sind Bifidobakterien nicht direkt mit Milchsäurebakterien verwandt (Felis *et al.*, 2007). Sie betreiben eine spezielle, heterofermentative Form der konventionellen Milchsäuregärung, „bifid shunt“ genannt. Diese baut auf dem Enzym Fructose-6-phosphoketolase auf, welches einzigartig für Bifidobakterien ist und bildet den zentralen Stoffwechselweg, über den Hexosen abgebaut werden (de Vries *et al.*, 1967). Durch eine Vielzahl weiterer Enzyme können C-Quellen wie Stärken, Cellulose, Hemicellulose,

Glykogen, Galactan, Xylan, Pullulan, Pektine, Mucine und Glycosphingolipide für den bifid shunt enzymatisch angepasst werden, sodass auch diese abgebaut werden können (de Vrese *et al.*, 2008). Eine aktuelle Studie zeigt, dass mehr als 12 % der untersuchten Gene für Enzyme codieren, die am Stoffwechsel für Kohlenhydrate beteiligt sind (Milani *et al.* 2014). Bifidobakterien konnten nicht nur die Bandbreite an potentiellen Substraten erhöhen, sie erzielen auch eine um 25 % erhöhte ATP-Ausbeute im Vergleich zur homofermentativen Milchsäuregärung (Pokusaeva *et al.*, 2011).



Theoretisch werden beim bifid shunt, wie in Abbildung 1 gezeigt, Acetat und Lactat im Verhältnis 3:2 gebildet, jedoch variiert dieses je nach verstoffwechselter C-Quelle, Stoffwechselschwindigkeit und Spezies (O' Callahan *et al.*, 2016). Der bifid shunt stellt den wichtigsten Stoffwechselweg für Bifidobakterien dar, wenngleich sie sich auch anderen bedienen können.

### 1.1.2 Bedeutung für den Menschen

Die Besiedelung des menschlichen Darms durch Bifidobakterien beginnt bei der Geburt und ist von Faktoren wie der Geburtsmethode, Fütterungsmethode, Hygiene, Antibiotikakontakt und Frequenz und Art von Erkrankungen, insbesondere gastrointestinalen Infektionen, abhängig (Fanaro *et al.*, 2003). Während die natürliche, gesunde Darmflora in jungen Jahren zu einem großen Teil aus Bifidobakterien besteht, nimmt ihre Anzahl im Laufe des Lebens ab. Weiterhin können Krankheiten wie Morbus Crohn, Diabetes und Fettleibigkeit aber auch Allergien und Stress die Population von intestinalen Bifidobakterien stark dezimieren (Mattarelli *et al.*, 2014). Bifidobakterien werden probiotische Einflüsse auf den menschlichen Körper nachgesagt. Unter anderem die Reifung und Regulierung des Immunsystems sowie schützende Aktivitäten gegen pathogene Keime durch Bildung von Bacteriocinen und Blockierung der Adhäsion solcher Keime (Rastall *et al.*, 2005). Außerdem fördern sie den natürlichen Stoffwechsel durch Produktion von Vitaminen und Säuren, welche die Bewegung des Darms stimulieren. Dadurch erschweren sie die Bevölkerung durch andere Bakterien wie Listerien, Enterokokken oder Clostridien, welche mit dem jungen Menschen um Nährstoffe konkurrieren könnten (O' Callahan *et al.*, 2016). Aus diesen Gründen kann man von einer symbiotischen Beziehung zwischen der Darmflora und ihrem Wirt sprechen. Im Darm von gesunden erwachsenen Menschen finden sich folgende Spezies von Bifidobakterien: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. longum*, *B. scardovii* (Leahy *et al.*, 2005).

### 1.1.3 *Bifidobacterium thermophilum*

Bei *B. thermophilum* handelt es sich um eine nicht weit erforschte Spezies der Gattung *Bifidobacterium*. In der NCBI-Gendatenbank finden sich drei veröffentlichte Genome dieser Spezies. *B. thermophilum* wird üblicherweise aus Kuhmägen, Abwässern und Kot von Ferkeln, Kälbern und Säuglingen isoliert (Touré *et al.*, 2003). Im Vergleich zu anderen Spezies der Gattung *Bifidobacterium* ist *B. thermophilum* relativ aerotolerant und erreicht hohe Zelldichten in Fermentationen (Biavati *et al.*, 2009). Drei Publikationen, die sich alle auf *B. thermophilum* RBL67 beziehen, konnten die antimikrobielle Aktivität von RBL67 gegen verschiedene Spezies der Gattung *Salmonella* feststellen (Jans *et al.*, 2013; Tanner *et al.*, 2014; Tanner *et al.*, 2016).

## 1.2 Probiotik

„Probiotika sind als Mono- oder Mischkulturen von lebenden Mikroorganismen definiert, die, wenn sie auf Mensch oder Tier angewandt werden, den Wirt vorteilhaft beeinflussen, indem sie die Eigenschaften der indigenen Mikroflora verbessern“ (Havenaar *et al.*, 1992).

Fermentierte Lebensmittel wie Kefir oder Kumys (vergorene Stutenmilch) stellen die frühzeitigsten Probiotika dar, auch wenn damals noch nicht von probiotischer Wirkung gesprochen wurde. Die probiotische Wirkung von Bakterien hat in der Vergangenheit das Interesse der Lebensmittel- und Medizinindustrie geweckt. Seit mehr als 20 Jahren werden Erkrankungen des gastrointestinalen Trakts mit der Gabe von Probiotika erfolgreich behandelt (O' Callaghan *et al.*, 2016).

## 1.3 Bakteriophagen

Bakteriophagen sind Viren, die Bakterien und Archaeen befallen (Clokic *et al.*, 2011). Sie besitzen weder einen Replikationsapparat noch einen Stoffwechsel, was sie als obligat intrazelluläre Parasiten auszeichnet. Es wird geschätzt, dass Phagen mit  $10^{31}$  Partikeln die häufigste biologische Einheit der Welt darstellen (McNair *et al.*, 2012).

### 1.3.1 Allgemeines

Abbildung 1 zeigt die Klassifizierung von Phagen basierend auf ihrer Morphologie und reicht von geschwänzten (A bis C) über polyedrische (D und E) bis zu filamentösen (F) Phagen (Bradley, 1967). Durch Einteilung der geschwänzten Phagen anhand ihrer Kopfform in isometrisch,

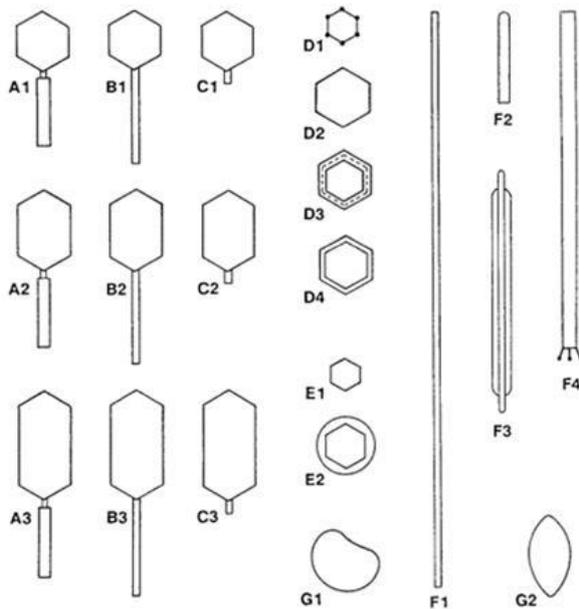


Abbildung 1: Einteilung der Phagen in die Morphotypen A bis G nach Ackermann (2001).

prolat und lang-prolat sowie der Einführung von pleomorphen Phagen (G), wurde diese Einteilung modifiziert (Ackermann *et al.*, 1974). Die geschwänzten Phagen umfassen 96 % aller bekannten Phagen. Sie bilden die Ordnung *Caudovirales*, die sich in die Familien *Myoviridae*, *Siphoviridae* und *Podoviridae* mit unterschiedlichen Schwanzstrukturen gliedert (Ackermann, 2007). Die Phagen der *Myoviridae* Familie besitzen einen langen kontraktilen Schwanz. Die *Siphoviridae* Phagen mit einem langen flexiblen, aber nicht-kontraktilen Schwanz machen mit 61 % die größte Familie aus (Mahony *et al.*,

2012). Ein kurzer nicht-kontraktiler Schwanz zeichnet die Phagen der *Podoviridae* Familie aus. Nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip kann ein Phage nur an einen bestimmten Rezeptor binden, weshalb die meisten Phagen sehr spezifisch für eine Bakterienspezies oder sogar einen Bakterienstamm sind (Moldovan *et al.*, 2007).

Nach Injektion seiner DNA kann ein temperenter Phage als Prophage in das Genom der Wirtszelle integrieren oder als freies Plasmid in der Zelle vorliegen (Mardanov und Ravin, 2007). Die Integration erfolgt durch Rekombination zwischen homologen Sequenzbereichen, der *phage attachment site (attP)* im Phagengenom und der *bacterial attachment site (attB)* im Bakteriengenom, sodass der integrierte Prophage im Genom von der *attL (left)* und *attR (right)* flankiert wird. Bei jeder Teilung der Bakterienzelle wird der Prophage passiv vermehrt, indem er an die Tochterzellen weitergegeben wird (Poeggel, 2013). Bakterien, die einen Prophagen tragen, werden als lysogen bezeichnet. Im lysogenen Zustand werden die Gene zur lytischen Vermehrung des Phagen stark reprimiert (Mardanov *et al.*, 2007). Dadurch bedingt ist der lysogene Zustand relativ stabil (Little *et al.*, 1999), kann aber in die lytische Entwicklung übergehen. Dieser als Induktion bezeichnete Prozess findet häufiger spontan ohne externen Auslöser (Ghosh *et al.*, 2009; Helfrich *et al.*, 2015) sowie in Reaktion auf die SOS-Antwort der Wirtszelle statt (Kim *et al.*, 2013). Die SOS-Antwort ist ein globales, regulatives Netzwerk in Bakterien, das durch DNA-Schädigungen aktiviert wird (Erill *et al.*, 2007) und als Teil der bakteriellen Stressantwort zur DNA-Reparatur dient.

### 1.3.2 Bakteriophagen der Gattung *Bifidobacterium*

Es sind bis heute nur sehr wenige Phagen oder Phagen-ähnliche Strukturen bekannt, welche die Gattung der Bifidobakterien befallen, obwohl für phylogenetisch verwandte Bakterien wie *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, and *Streptomyces* viele Phagen-Sequenzen beschrieben sind (Casjens, 2003). Allerdings sind nur wenige dieser Phagen komplett und besitzen die Fähigkeit der spontanen Induktion. 2005 wurden drei dieser Prophagen-ähnliche Strukturen, welche in den Genomen von *Bifidobacterium breve* UCC 2003, *Bifidobacterium longum* NCC 2705 und *Bifidobacterium longum* DJO10A vorkommen, analysiert (Ventura *et al.*, 2005). Für zwei dieser Prophagen-ähnlichen Strukturen wurden Größen von 36,9 kb und 28,5 kb angegeben. Interessant für diese Arbeit ist, dass der größere der Prophagen mit Mitomycin C und Wasserstoffperoxid induziert werden konnte.

## 2 Zielsetzung

Im Max Rubner-Institut wurde ein Tierversuch zur Erprobung der probiotischen Wirkung von Bifidobakterien im intestinalen Raum bei Mäusen durchgeführt. Dabei kam der *Bifidobacterium*-Stamm (hausinterne Stammnummer 94004) zum Einsatz, welcher vorab aus einer Reihe von *Bifidobacterium*-Stämmen aus der hauseigenen Stammsammlung als vielversprechender Kandidat ausgewählt wurde. Der durchgeführte Tierversuch wurde zum Zeitpunkt des Einreichens dieser Arbeit noch nicht veröffentlicht. In den Produktionen des *Bifidobacterium* 94004 im Bioreaktor kam es bei der Bestimmung der Lebendkeimzahl (LKZ) am Ende der Kultivierung zu extremen Schwankungen im Bereich von  $10^7$ - $10^{10}$  KBE ml<sup>-1</sup>. Eine Aufnahme des Kulturüberstandes mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) konnte die Annahme stützen, dass die lysierende Wirkung von Bakteriophagen die Ursache sein könnte, denn es wurden Phagen in geringer Konzentration gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich heraus, dass es sich bei dem *Bifidobacterium*-Stamm 94004 um die Spezies *Bifidobacterium thermophilum* handelt.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung des entdeckten Bakteriophagen, der die hausinterne Bezeichnung „Willi“ trägt und daher auch in dieser Arbeit so bezeichnet wird. Ein weiteres Ziel ist die Isolierung einer Prophagen-kurierten Variante des *B. thermophilum* Stammes 94004. Um eine zufällige Entdeckung oder Kontamination auszuschließen, werden die Kultivierung des *B. thermophilum* Stammes und die anschließende Aufreinigung der Phagen mittels CsCl-Gradienten-Ultrazentrifugation wiederholt. Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) soll Informationen über die Morphologie des Phagen liefern. Die Aufnahme eines Wirtsspektrums soll Bakterienstämme aufzeigen, auf denen sich der Phage lytisch vermehrt. Mithilfe dieser Indikatorstämme können dann genaue Titerbestimmungen durchgeführt werden. Des Weiteren soll eine molekularbiologische Analyse des Bakterien- und Phagenoms nach einer Sequenzierung durchgeführt werden. Die Erprobung der Induzierbarkeit des Phagen ist ebenfalls Gegenstand der Untersuchung. Ließe sich der Phage induzieren, könnte der Selektionsdruck gezielt erhöht werden, um Prophagen-kurierte Varianten des Bakteriums zu finden. Bei erfolgreicher Isolierung eines solchen Klons könnte dessen Kultivierung Aufschluss über Einflüsse des Phagen auf die Physiologie des Wirtsstammes geben, indem ein direkter Vergleich der Kultivierungsergebnisse gezogen würde. Schließlich wird ein Isolierungsversuch durchgeführt, in dem nach natürlich vorkommenden Phagen-kurierten Klonen gescreent wird.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Geräte, Software und Materialien

Die verwendeten Geräte und Materialien sind in den nachfolgenden Texten und Tabellen zu finden. Angaben zu den Herstellern finden sich in Tabelle 14 und 16 im Anhang. Zur Arbeit verwendete Software wurde in Tabelle 15 im Anhang zusammengetragen.

### 3.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Die Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien finden sich in Tabelle 17 im Anhang. Lösungen und Puffer (s. Anhang Tab. 18) wurden mit Reinstwasser (rH<sub>2</sub>O, arium® pro Reinstwasser System, Sartorius) angesetzt. Deren pH-Wert wurde mit HCl, Essigsäure oder NaOH am pH-Meter (Delta 340, Mettler-Toledo) eingestellt. Vor Gebrauch wurden die Lösungen und Puffer autoklaviert (15 min bei 121°C) oder bei Hitzeempfindlichkeit filtriert (Whatman®, Porengröße 0,2 µm).

### 3.3 Mikrobiologischer Umgang mit Bifidobakterien

Alle verwendeten *Bifidobacterium* Stämme wurden von der hausinternen Stammsammlung, in der sie bei -72 °C in Kryo-Röhrchen mit 15 % Glycerin (89 % v/v) eingefroren sind, bezogen. Bei Bedarf wurde unter sterilen Bedingungen mit einem Einmal-Spatel eine kleine Menge abgenommen und direkt in ein vorbereitetes Kulturröhrchen mit 10 ml Medium gegeben.

#### 3.3.1 Kulturmedien

Die Standardanzucht für Bifidobakterien erfolgte in MRS-Medium, das ursprünglich 1960 von De Man, Rogosa und Sharpe für die Gattung *Lactobacillus* entwickelt wurde (De Man *et al.*, 1960). Dem Medium wurde 0,05 % Cystein zugegeben, um vorab das Redoxpotential zu senken und so bessere Bedingungen für das anaerobe Wachstum von Bifidobakterien zu schaffen (Roy *et al.*, 2001). Das fertige Medium ist klar, hat eine bräunliche Farbe, wirkt nicht selektiv und enthält Glukose als Primärsupstrat. Verwendet wurde Merck MRS Broth (110661). Dieses hat eine Löslichkeit von 50 g l<sup>-1</sup> und besitzt einen pH-Wert von 5,7 ± 0,2 bei 25 °C.

Des Weiteren kam Tryptone-Phytone-Yeast-Medium (TPY) zum Einsatz, welches speziell für die Anzucht von Bifidobakterien entwickelt wurde (Scardovi *et al.*, 1986). Dabei handelt es sich um ein komplexes, nicht-selektives Medium, das ebenfalls klar ist und eine gelbliche Färbung hat.

Für das Ansetzen der Medien wurde deionisiertes Wasser verwendet. Vor dem Autoklavieren bei 121 °C für 15 min wurden die Medien in Kulturröhrchen abgefüllt (à 10 ml).

*Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Medien.*

Medium	Zusammensetzung	Menge
MRS-Medium	Glukose · H <sub>2</sub> O	22 g
	Trypton	10 g
	Fleischextrakt	5 g
	Hefeextrakt	5 g
	Natriumacetat	5 g
	Di-Kaliumhydrogenphosphat	2 g
	Di-Ammoniumhydrogencitrat	2 g
	Magnesiumsulfat · 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
	Mangansulfat · H <sub>2</sub> O	0,056 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
MRS-Agar	MRS-Medium	1000 ml
	Agar Agar	15 g
TPY-Medium	Glukose · H <sub>2</sub> O	16,5 g
	Trypton	10 g
	Pepton	5 g
	Hefeextrakt	2,5 g
	Di-Kaliumhydrogenphosphat	2 g
	L-Cystein · HCl · H <sub>2</sub> O	1,06 g
	Polysorbat 80	1 g
	Magnesiumchlorid · 6 H <sub>2</sub> O	0,725 g
	Zinksulfat · 7 H <sub>2</sub> O	0,44 g
Calciumchlorid · 2 H <sub>2</sub> O	0,2 g	
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
TPY-Agar	TPY-Medium	1000 ml
	Agar Agar	15 g
TPY-Soft-Agar	TPY-Medium	1000 ml
	Agar Agar	7,5 g

Für die Herstellung von festen Nährböden in Petrischalen wurde das Medium mit zugegebenem Agar Agar aufgeköcht. Nach dem Autoklavieren wurden die Petrischalen unter der Sterilwerkbank befüllt und die Nährböden getrocknet.

### 3.3.2 Standard-Anzucht

Obwohl *B. thermophilum* eine aerotolerante Spezies ist, wird für eine optimale Wachstumsumgebung ein anaerobes Milieu benötigt. Die Kulturröhrchen wurden nach sterilem An- oder Überimpfen mit einer Kappe versehen und zusammen mit einem Beutel zur Erzeugung anaeroben Milieus (AnaeroGen 2,5 l, Thermo Fisher Scientific) in einen Anaerobentopf (AnaeroCult 2,5 l, Thermo Fisher Scientific) gestellt und bei 37 °C für 48 h inkubiert. Nach ca. 34 min stellt sich ein Sauerstoffgehalt von 0,5 % ein (Imhof *et al.*, 1996). Thermo Fisher Scientific verspricht das Erreichen eines CO<sub>2</sub>-Gehalts von 9-13 % nach höchstens 24 h.

### 3.3.3 Anzucht im Hungate-System

Diese Methode beschreibt die Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen in verschließbaren Kulturgefäßen, die mit sauerstofffreiem Kulturmedium und Gas gefüllt sind (Hungate, 1969). Heutzutage erfolgt die Beimpfung und Probennahme durch ein Septum. Den Kulturmedien werden üblicherweise Reduktionsmittel wie L-Cystein zugesetzt.

Für diese Anzucht wurde ausschließlich TPY-Medium verwendet, da es bereits Cystein als Reduktionsmittel enthält. Nach dem Ansetzen in einer 1 l-Schott-Flasche (max. 500 ml wegen Schaumbildung) wurde das Medium vorsichtig für 30 min über eine lange Kanüle mit Stickstoff entgast (Vordruck 0,5 bar). Im nächsten Schritt erfolgte das Abfüllen des Mediums in saubere Hungate-Röhrchen mit frischen Schraubverschlüssen und Septen. Dafür wurde das Röhrchen mit Stickstoff ausgeblasen, zügig 5 ml Medium mittels Pipette eingefüllt und das Röhrchen verschlossen. Anschließend wurden die fertigen Kulturröhrchen für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

Um die Hungate-Röhrchen zu beimpfen, wurde eine Standard-Übernachtkultur in TPY-Medium verwendet. Unter der Sterilwerkbank wurden mit einer 2 ml-Einmal-Spritze eine kleine Menge der Übernachtkultur abgenommen und vorsichtig mittels Kanüle durch das Septum in das Medium gegeben. Danach konnte das beimpfte Kulturröhrchen im temperierten Wasserbad inkubiert werden.

### 3.3.4 Bestimmung der Lebendkeimzahl

Die Keimzahlbestimmung hat die Auszählung der vermehrungsfähigen Mikroorganismen pro Milliliter der untersuchten Kultur als Ziel. Hierfür wurde das Spatelplattenverfahren angewendet. Bei der ermittelten Zahl wird dabei allerdings von Koloniebildenden Einheiten (KbE) gesprochen, da die Zellen zufällig zusammenhängen können oder Zellaggregate bilden.

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe bis 10<sup>-8</sup> unter sterilen Bedingungen hergestellt. Unter Einsatz von steriler Ringerlösung wurde jede Stufe 1:10 verdünnt und mindestens 30 Sekunden

gründlich durchmischt (Vortexmischer). Mit einem Drigalskispatel konnten dann je 100 µl der letzten drei Verdünnungsstufen auf Nährböden ausgestrichen werden. Dabei wurden pro Verdünnungsstufe zwei Platten angefertigt, um eine Doppelbestimmung machen zu können. Die Kulturen wurden dann für 48 h bei 37 °C in einem Anaerobentopf bebrütet. Schließlich wurden die einzelnen Kolonien auf den Platten gezählt und die Lebendkeimzahl  $N$  berechnet.

$$N = \frac{C}{0,1 \text{ ml} [n_1 + (0,1 n_2) + (0,01 n_3)] d}$$

$C$  = Summe der Kolonien auf allen Platten

$n_i$  = Anzahl der auswertbaren Platten der ausgestrichenen Verdünnungsstufe

$d$  = Verdünnungsfaktor der niedrigsten ausgestrichenen Verdünnungsstufe

### 3.4 Gewinnung von Phagen

Zur Produktion des Phagen wurde *B. thermophilum* 94004 unter den Bedingungen kultiviert, welche beim erstmaligen Auffinden des Phagen angewendet wurden.

#### 3.4.1 Kultivierung von *B. thermophilum* 94004 im Bioreaktor

Einen Tag vor der Fermentation wurde die Vorkultur 1-%ig beimpft und 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Phagenproduktion erfolgte in einem 2l-Bioreaktor (Biostat B, Sartorius), welcher mit einem Füllgrad von 3/4 betrieben wird. Nach einer gründlichen Überprüfung aller Geräte, Dichtungen, Zu- und Abläufe, Filter, Steckverbindungen und der Stickstoff-Versorgung, wurde die pH-Sonde auf einen sauren pH-Bereich (4-7) kalibriert. Auf die Montage der Sonden und einer Schott-Flasche mit Natronlauge folgte das Einfüllen des Mediums über einen freien Deckelstutzen. Danach wurden freie Stutzen und Eingänge verschlossen, Filter und Lauge abgeklemmt, Steckverbindungen und Sonden mit Alufolie geschützt und der Bioreaktor für 15 min bei 121 °C in einem Autoklav sterilisiert. Anschließend wurden alle Verbindungen zur digitalen Kontrolleinheit (DCU) hergestellt und der Motor an die Rührwelle angeschlossen.

Tabelle 2: Betriebsparameter und Ausstattung des Bioreaktors.

Betriebsparameter		Ausstattung	
Medium	TPY	Begasungsrohr mit Zuluftfilter	
Medienvolumen	1,5 l	Deckeldurchgänge für pH-Regelung und Kopfraumbegasung	
Animpfvolumen	1% (15 ml)	Gegenstromabluftkühler	
Temperatur	37 °C	pH-Sonde	
pH-Wert	5,0	pO <sub>2</sub> -Sonde	
Rührerdrehzahl	75 n min <sup>-1</sup>	pt100-Temperaturfühler	

Betriebsparameter	
Begasungsrate	0,05 l min <sup>-1</sup>
NaOH-Konz.	5 %

Ausstattung
Probenahmerohr
Rührwelle mit Propellerrührer
Schikanenkorb

Tabelle 2 zeigt die Betriebsparameter der Fermentation. Diese wurden nach dem Autoklavieren an der DCU eingestellt. Der gelöste Sauerstoff im Medium wurde mit Stickstoff über das Begasungsrohr entgast. Am nächsten Tag wurde das Wachstum der Vorkultur durch eine Sichtprüfung und Messung der optischen Dichte (OD, Spectronic, Milton Roy) kontrolliert. Die Kultur wurde hierfür 1:10 verdünnt, um einen Messwert  $< 1,0$  zu erhalten. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass der Gültigkeitsbereich des Lambert-Beer'schen Gesetzes eingehalten wurde. Werte, die über diesem Grenzwert gemessen werden, können nicht als ausreichend genau angesehen werden (Bergter, 1983). Sollte die Vorkultur ausreichendes Wachstum ( $OD > 3$ ) erkennen lassen, kann der Bioreaktor beimpft werden. Unter der Sterilwerkbank (LaminAir, Heto Holten) wurden mit einer sterilen Spritze und Kanüle 15 ml aus der Vorkultur entnommen und unter Flammenschutz durch die Anstechmembran im Deckel des Bioreaktors eingetragen. Zu diesem Zeitpunkt wurde die vorbereitete, automatische Parameteraufzeichnung über das Multi-Fermenter-Kontroll-System (MFCS 3.0) am Computer synchronisiert. Bei Erreichen des voreingestellten pH-Wertes (s. Tab. 2) startete die Regelung und gab Natronlauge (NaOH) zu der Kultur. Die Fermentation wurde beendet als der pH-Wert ohne weitere Zugabe von NaOH konstant blieb, d. h. keine Stoffwechselaktivität der Bakterien mehr vorhanden war. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Probe genommen, um diese auf aktive Phagen im TEM zu untersuchen.

Im nächsten Schritt wurde der Fermenterinhalt geerntet und zentrifugiert, um das Phagenlysat zu erhalten. Der Bioreaktor wurde unter eine Sterilwerkbank gestellt und der Fermenterinhalt mit einer Peristaltikpumpe (505U, Watson Marlow) über einen sterilen Schlauch auf vier sterile Zentrifugenbecher (500 ml) aufgeteilt. Abschließend wurden die Zentrifugenbecher ausreichend tariert (Abweichung  $< 0,01g$ ) und dann für 10 min bei 7000 rpm und 4 °C zentrifugiert (J2-21, Rotor JA-10, Beckman Coulter). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und gesammelt (Phagenlysat).

Für spätere Versuche wurde aus einer Spatelspitze des Pellets die DNA extrahiert und eingefroren. Eine weitere kleine Menge des Pellets wurde als Kryo-Kultur in die Stammsammlung aufgenommen.

### 3.4.2 Phagenaufreinigung mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Zunächst wurde freie DNA und RNA aus den lysierten Bakterien abgebaut. Hierfür wurde das Phagenlysat mit DNase und RNase versetzt (Endkonz. 3 mg l<sup>-1</sup>) und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden verbleibende Zelltrümmer entfernt. Dafür wurde Natriumchlorid zugegeben (Endkonz. 1 M) und sehr vorsichtig gelöst. Bei der anschließenden Zentrifugation (10 min, 7000 rpm, 4 °C) wurden die Zelltrümmer als Pellet abgetrennt. Im folgenden Aufreinigungsschritt wurden die Phagen unter der Zugabe von PEG 6000 (Endkonz. 10 % w/v) gefällt, nachdem dieses eine Stunde leicht eingerührt und über Nacht inkubiert wurde. Letztlich wurden die Phagen abzentrifugiert (20 min, 8000 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml SM-Puffer (pH 7,5) resuspendiert. Dieser Puffer bietet ideale Lagerungsbedingungen für Bakteriophagen und wird in diesem Fall ohne Gelatine angesetzt (Sambrook *et al.*, 2001).

Bei der Gradienten-Zentrifugation macht man sich unterschiedliche Dichten einer Lösung, in diesem Fall Cäsiumchlorid (CsCl) in SM-Puffer, zunutze. Dabei reichern sich die Phagen in einer sichtbaren bläulichen Bande bei definierter Dichte von  $\rho \sim 1,4-1,45$  an.

Tabelle 3: Herstellung der CsCl-Lösungen und des Gradienten.

CsCl-Dichte in kg l <sup>-1</sup>	CsCl in g		SM-Puffer in g	Vol. im Gradient in ml
1,2	8,72		39	2
1,3	13,10		42	4
1,4	17,45	Auffüllen	45	2
1,45	19,63	auf	46,5	2
1,5	21,80		48	1
1,7	30,50		54	1

Anhand der Tabelle 4 wurden unterschiedliche Lösungen hergestellt, die jeweils ein Endvolumen von 30 ml besitzen. In einem offenen Zentrifugenröhrchen werden die Lösungen dann mit abnehmender Dichte aufgeschichtet (Volumen s. Tab. 3). Der fertige Gradient wird dann mit dem angereicherten Phagenlysat überschichtet. Die Zentrifugation erfolgt für 20 h bei 10 °C und 25000 rpm (Optima L-90K; Rotor SW32.1 Ti, Beckman Coulter). Sollte eine sichtbare Bande vorhanden sein, können die Phagen mittels Spritze und Kanüle abgenommen werden.

### 3.5 Transmissionselektronenmikroskopie von Phagen

Die Aufnahme von Bildern mittels TEM wurde freundlicherweise von Frau A. Back durchgeführt. Die einzelnen Schritte der Durchführung werden für die Reproduktion in nachfolgenden wissenschaftlichen Arbeiten aufgeführt.

Die Morphologie der Phagen wurde mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Tecnai 10 von Philips untersucht. In der Bedampfungsanlage wurde ein Kohlefilm auf eine frisch gespaltene Glasglimmerplatte aufgedampft. Die Glasglimmerplatte wurde in Quadrate geschnitten (3 x 3 mm) und der Kohlefilm von diesen durch Eintauchen in 100 µl Phagenlysat (Titer  $>10^6$  PbE ml<sup>-1</sup>) abgelöst. Nach 20-minütiger Absorptionszeit wurde der Kohlefilm in zwei Tropfen rH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend für wenige Sekunden in 2 %iger Uranylacetat-Lösung angefärbt, bevor er auf ein 400-*mesh*-Kupfernetz (Agar Scientific) übertragen wurde. Überschüssiges Färbemittel wurde mit einem Filterpapier abgezogen. Die getrockneten Proben wurden in das TEM geschleust und bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV angesehen. Die Aufnahmen der Phagen wurden mit einer CCD-Kamera (Megaview G2, SIS Olympus) bei einer Primärvergrößerung von 160.000x bis zu 210.000x angefertigt. Die Bildanalyse wurde mit der iTEM 5.2 TEM Imaging Plattform Software (SIS Olympus) durchgeführt.

### 3.6 Spot-Test: Analyse des Phagen-Wirtsspektrums

Als potenzielle Indikatorstämme für „Willi“ wurden aufgrund enger Verwandtschaft zum *Bifidobacterium thermophilum* 22 *Bifidobacterium adolescentis* Stämme aus der hauseigenen Stammsammlung ausgewählt. In diesem Versuch kam aufgrund der helleren Farbe und damit besseren Sichtbarkeit für Spots ausschließlich TPY-Medium zum Einsatz. Beim Spot-Test werden Bakterien in Soft-Agar auf Petrischalen kultiviert, nachdem eine bestimmte Menge Phagenlysat auf die Oberfläche gegeben wurde (Inkubation für 24 h bei 37 °C). Idealerweise werden dann neu wachsende Bakterien in dem Bereich, in dem die Phagen vorhanden sind, lysiert. In den anderen Bereichen wuchsen die Bakterien ungehindert. Am Ende entsteht ein „Spot“, in dem keine oder nur sehr wenige Bakterien gewachsen sind. Bei einem sichtbaren Spot kann von einem Wirtstamm für den aufgegebenen Phagen gesprochen werden.

Auf vorgewärmten TPY-Agar-Platten wurde folgende Mischung gegeben: 100 µl einer Standard-Übernachtskultur, 300 µl CaCl (40 mM) und 3 ml flüssiger TPY-Soft-Agar. Nach gleichmäßiger Verteilung der Mischung und anschließender Erhärtung des Soft-Agars wurden 10 µl Phagenlysat mittig aufgetragen. Es wurden Phagenlysate gespottet, welche über die CsCl-Gradienten-Zentrifugation gewonnen wurden. Diese Phagenlysate wurden während (Phagenlysat 1)

und vor (Phagenlysat 2) der Anfertigung dieser Arbeit hergestellt. Nach dessen Herstellung wurden die Platten für 48 h bei 37 °C in einem Anaerobtopf inkubiert.

## 3.7 Genomsequenzierung des *B. thermophilum* Stammes 94004 und des Phagen

### 3.7.1 DNA-Extraktion und Aufreinigung

Zur Extraktion der genomischen DNA von *B. thermophilum* 94004 kam das *peqGOLD Bacterial DNA Mini Kit* von (Peqlab, VWR) zum Einsatz. Dabei können bis zu  $1 \cdot 10^9$  Zellen in einem Ansatz aufgeschlossen und bis zu 30 µg DNA extrahiert werden. Die Aufreinigung macht sich die selektive und reversible Bindungskapazität von Silikamembranen zunutze. Der Zellaufschluss erfolgt mit Lysozym, Proteinase K und parallelem RNase-Verdau. Die freie DNA wurde in einem Puffersystem an die Säulenmembran gebunden und konnte nach zwei Waschschritten, welche Zelltrümmer und Salze sowie Kontaminationen entfernten, in sogenannten Elution Buffer oder Wasser eluiert werden. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration mittels Spektralphotometrie bestimmt. Die detaillierten Arbeitsschritte und Materialien sind im Anhang (s. Tab. 20) aufgelistet. Zur Isolierung von Phagen-DNA wurde das *Phage DNA Isolation Kit* (Norgen Biotek Corp.) eingesetzt und das Protokoll des Herstellers angewendet. Als Ausgangsmaterial wurde 1 ml CsCl-gereinigtes Phagenlysat (s. Kap. 3.4.2) eingesetzt.

### 3.7.2 Genomsequenzierung mittels ILLUMINA MiSeq und Analysen

Die Genomsequenzierung wurde freundlicherweise von Herrn E. Brinks durchgeführt. Dabei wurde für die DNA library preparation das *Nextera DNA Library Preparation Kit* (ILLUMINA) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Sequenzierung des Bakteriums wurde mit dem *MiSeq Reagent Kit v3* durchgeführt; die des Phagen wiederum mit dem *MiSeq Reagent Kit v2*.

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der Geneious Version 9.1.2. So wurden die einzelnen überlappenden Reads *de novo* zu größeren Contigs zusammengesetzt (Assembly). *De novo* bedeutet, dass die Zusammensetzung ohne ein Referenzgenom erfolgt. Die assemblierten Genome wurden dann automatisch mittels RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology, Aziz *et al.*, 2008) annotiert. Unter Annotation versteht man die Suche nach Open Reading Frames (ORF) und deren funktionelle Zuordnung.

## 3.8 Prophagen-Induktionsversuche

Zur Erprobung der Induzierbarkeit des Prophagen wurden zwei Methoden angewandt, die seit der Pionier-Arbeit von André Lwoff *et al.* (1953) standardmäßig eingesetzt werden, um die Lysogenie von Phagen zu untersuchen. Dabei kamen zum einen das antineoplastische Antibiotikum Mitomycin C (MMC) als auch UV-Strahlung zum Einsatz. Auf die Kultur angewendet, schädigen diese Umweltreize in Form von Doppelstrangbrüchen die DNA und bewirken so die Expression von sogenannten SOS-Genen, die letztendlich zur Aktivierung der Phagengene führen (Little *et al.*, 1981).

### 3.8.1 ... mit Mitomycin C

Die Prophagen von Milchsäurebakterien wie *Lactococcus lactis* und *Streptococcus thermophilus* werden üblicherweise mit MMC-Konzentrationen von 0,1 bis 0,3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  induziert. Neben diesen Konzentrationen wurden außerdem in zwei getrennten Versuchen aus der Literatur stammende Konzentrationen (1 bis 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; Ventura *et al.*, 2005) und nochmals erhöhte Konzentrationen bis 7  $\mu\text{g ml}^{-1}$  verwendet. Die Induktionen wurden an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und die Übernachtskulturen, aus denen dafür angeimpft wurde, wurden für jeden Versuch neu angesetzt. Für jeden Versuchsansatz wurden fünf Hungate-Röhrchen aus einer Übernachtskultur so gering wie möglich (1-2 Tropfen) beimpft. Die Röhrchen wurden dann bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und die Kulturen bis zum Erreichen einer OD von etwa 0,2 kultiviert, was durch eine regelmäßige Messung kontrolliert wurde. Bei Erreichen des Wertes wurden den Kulturen unterschiedliche Mengen MMC zugegeben. Danach wurde die Kultivierung und regelmäßige Messung der OD fortgesetzt. In den ersten beiden Versuchen wurden die Kulturen über Nacht bei 37 °C im Wasserbad gelassen und am nächsten Morgen letzte Werte gemessen. Im letzten Versuch wurde über einen deutlich längeren Zeitraum von 72 h gemessen. In der ersten Nacht wurde die Kultur bei 4 °C gelagert und danach wieder bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss des Wachstums wurde eine geringe Menge der Kultur in der Verdünnungsstufe  $10^{-8}$  auf Agar-Platten ausgestrichen. Die Platten bestanden sowohl aus TPY- als auch MRS-Nährböden und wurden mit und ohne MMC Zugabe angesetzt (0,1 -0,3  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) und anaerob für 48 h bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden gepickt und mittels Kolonie PCR auf Prophagen untersucht (s. Kap. 3.9.1). Weiterhin wurde ein Teil der induzierten Kultur zentrifugiert und der Überstand durch eine PCR auf Phagen-DNA untersucht (s. Kap. 3.7.1).

### 3.8.2 ... mit UV-Licht

Die Kultivierung der Bakterien bis zur Induktion mit UV-Licht erfolgte identisch zu der MMC-Induktion (s.o.). Weiterhin wurde ein Kontrollstamm (*Bifidobacterium adolescentis* 94175) in

den Versuch integriert, um den Effekt der UV-Strahlung bei einem Prophagen-freien Bakterium vergleichen zu können. Es wurden also zwei Hungate-Röhrchen wie oben beschrieben beimpft und nach Erreichen einer OD von 0,2 jeweils die Hälfte der Kultur mit UV-Licht bestrahlt, während die andere Hälfte uneingeschränkt weiterwachsen konnte. Die Bestrahlung erfolgte im Abstand von 10 cm bei einer Wellenlänge von 254 nm für 10 min. Dafür wurden ca. 2 ml der Kulturen entnommen und unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegeben, welche dann ohne Deckel unter die Lampe gestellt wurden. Nach der Bestrahlung wurden die Kulturen in frische, vorgewärmte Hungate-Röhrchen gegeben und erneut im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und die OD regelmäßig gemessen. Der Nachweis eventuell vorhandener Phagen im Überstand erfolgte auch bei dieser Induktion mittels PCR (s. Kap. 3.7.1).

### **3.9 Isolierung eines Prophagen-kurierten Klons von *B. thermophilum* 94004**

Dieser Versuch diente der systematischen Suche nach natürlich vorkommenden Prophagen-kurierten Klonen des *B. thermophilum* 94004 Stammes. Als Ausgangsquelle hierfür kam die Kryokultur zum Einsatz, welche nach der Kultivierung im Bioreaktor aus dem Zellpellet gewonnen wurde. Aus der Kryo-Kultur wurde eine Standard-Kultur beimpft und nach 48 h Inkubation soweit verdünnt, dass drei Platten der Verdünnungsstufe  $10^{-8}$  ausgestrichen werden konnten. Die ausgewachsenen Kolonien (Klone) wurden nummeriert und jede einzelne zerteilt. Ein Teil der Kolonie wurde in eine Mikrotiterplatte mit frischem TPY-Medium als Rückstellprobe aufgenommen, während der andere Teil für einen Zellaufschluss mit anschließender zweistufiger PCR-Analyse verwendet wurde. Anhand der Ergebnisse der PCRs wurde letztlich entschieden, ob es sich bei dem Klon um eine Prophagen-kurierte Variante handelte. Schied ein Klon durch ein Ergebnis einer PCR aus, wurde er verworfen. Ein detailliertes Fließschema dieses Prozesses ist in Abbildung 2 zu sehen.

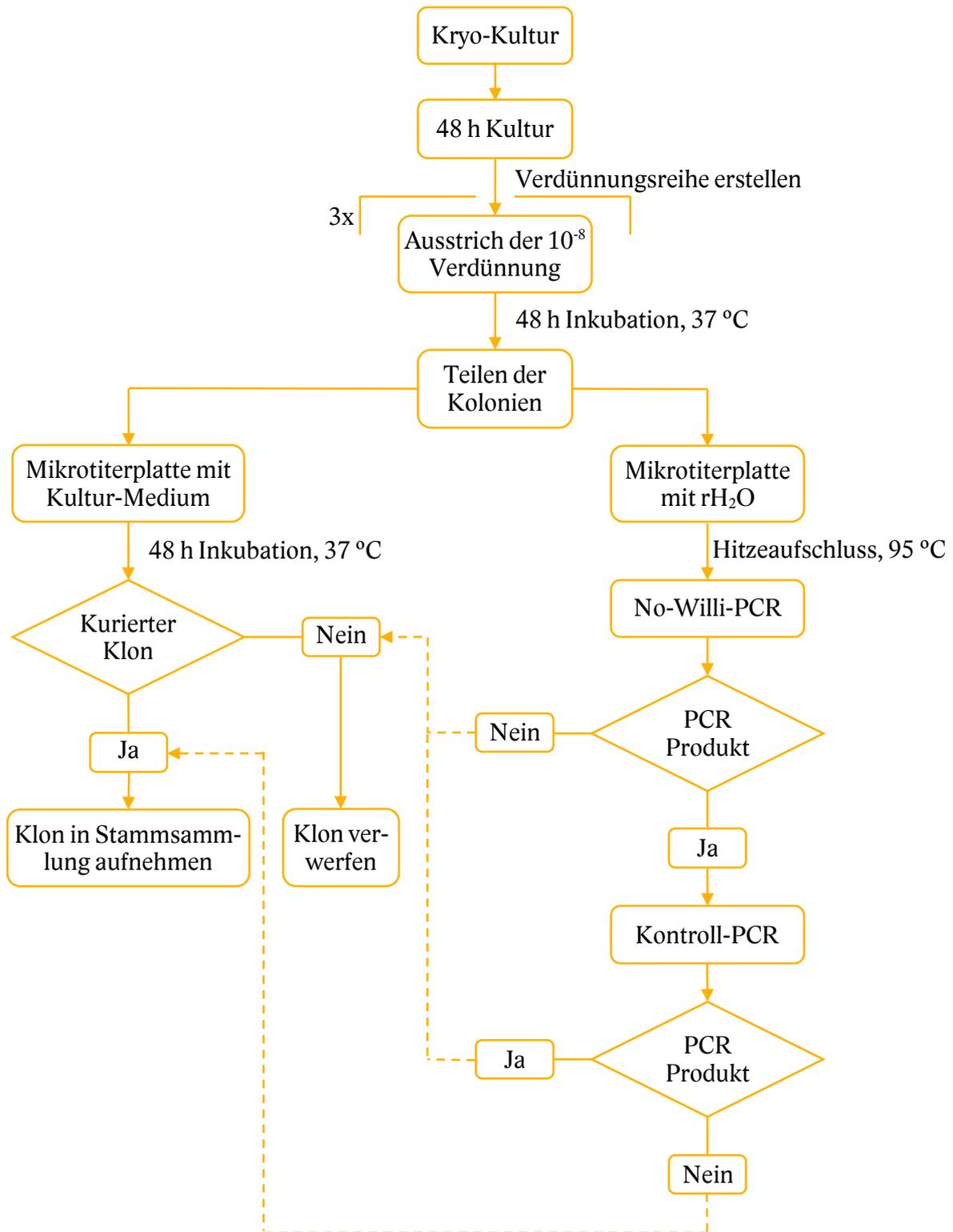


Abbildung 1: Fließschema zur Isolierung Prophagen-kurierter Klone von *B. thermophilum* 94004. Hauptschritte sind in abgerundeten Rechtecken und Verzweigungen in Rauten dargestellt.

### 3.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Es wurden Nachweissysteme entwickelt, um sowohl freie Phagen in Kulturüberständen als auch das Phagen genom innerhalb des Bakteriengenoms finden zu können. Des Weiteren wurde mittels PCR überprüft, ob Kolonien innerhalb des Screenings Phagen-kuriert waren.

#### 3.10.1 Nachweis von Phagen in Überständen

Für den Nachweis von „Willi“ nach der Induktion oder Kultivierung des *B. thermophilum* 94004 wurde zunächst 1 ml der Kultur bei 13000 rpm abzentrifugiert und anschließend steriltfiltriert (0,45 µm). Ein DNase-Verdau (Endkonz. 3 µg ml<sup>-1</sup>) entfernte freie bakterielle DNA im Überstand. Danach konnte der Überstand direkt in den PCR-Ansatz (25 µl) gegeben werden, der sich wie folgt aufbaute:

Tabelle 4: PCR-Ansatz zum Nachweis von „Willi“ (Tape-Measure-Gen).

Substanz	Konzentration	Volumen in µl
DreamTaq Green PCR Master Mix	2fach	12,5
Forward Primer	10 µM	1
Reverse Primer	10 µM	1
Template DNA	-	1
rH <sub>2</sub> O, Nuklease-frei	-	9,5
	Endvolumen	25 µl

Das Primer-Paar wurde so gewählt, dass ein PCR-Produkt entsteht, welches 2763 bp groß ist und dem Tape-Measure-Gen des Prophagen entspricht.

Verwendete Primer:

- Sequenz des Primers #57: '3- AAGGAACACGATGGCAGCAC -5'
- Sequenz des Primers #65: '3- CGCACGCGTATTCAAGCGAT -5'

Die Amplifizierung erfolgte in einem Thermocycler von Peqlab Biotechnology, bei der folgendes Programm angewendet wurde:

Tabelle 5: PCR-Protokoll zum Nachweis von „Willi“ (Tape-Measure-Gen).

Programmschritt	Temperatur in °C	Zeit in s
Initiale Denaturierung	95	180
Denaturierung	95	30
35x Hybridisierung	55	30
Elongation	72	170
Finale Elongation	72	420

Die Schritte Denaturierung bis Elongation bilden den Amplifikations-Zyklus und werden 35 Mal wiederholt. Als Positiv-Kontrolle wurde aufgereinigte Phagen-DNA (s. Kap. 3.8.1) eingesetzt. Die Kontrolle der Amplifikation erfolgte mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 3.9.3).

### 3.10.2 Identifikation von *B. thermophilum* 94004 mittels 16S-rRNA-Sequenzierung

Zusätzlich zur Genomsequenzierung wurde eine 16S-rRNA-Sequenzierung des *B. thermophilum* 94004 durchgeführt. Die genomische DNA wurde extrahiert und aufgereinigt (s.o.). Danach wurde in einer PCR das 16S-rRNA-Gen amplifiziert und zur Sequenzierung verschickt (GATC Biotech AG). Der PCR-Ansatz erfolgte wie in Tabelle 8 zu sehen. Als Primer kamen universelle 16S-Primer zum Einsatz. Das PCR-Protokoll unterschied sich lediglich in der Hybridisierungstemperatur von 57 °C, welche abhängig von den verwendeten Primern ist.

Verwendete Primer:

- Sequenz des Primers 27f: '3- AGRGTTYGATYMTGGCTCAG -5'
- Sequenz des Primers 1492R: '3- RGYTACCTTGTTACGACTT -5'

### 3.10.3 Nachweis von kurierten Klonen (Kolonie PCR)

Die zu analysierenden Kolonien wurden in jeweils 50 µl rH<sub>2</sub>O in einem Well einer Mikrotiterplatte aufgenommen und die Platte luftdicht verschlossen. Dann erfolgte der Hitzeaufschluss bei 95 °C für 15 min im Thermocycler. Nachdem die Platte abzentrifugiert wurde, konnte für jeden Klon ein PCR-Ansatz in einer neuen Mikrotiterplatte angesetzt werden (s. Tab. 8). Im ersten Schritt der zweistufigen PCR-Analyse, No-Willi-PCR genannt, wurden Primer verwendet, die direkt neben dem integrierten Phagen genom (upstream der *attL* und downstream der *attR*) und innerhalb des Bakteriengenoms binden. Auf diese Weise konnte nur dann ein Produkt gewonnen werden, wenn kein Prophage in dem Bakteriengenom vorhanden war. Die erste Generation dieser Primer (#77 & #78) ergab ein Produkt, dass ca. 600 bp groß war. Mit der zweiten Generation (#81 & #82) wurde ein Produkt generiert, dass ca. 1150 bp groß war. Im Falle einer erkennbaren Bande wurde der entsprechende Klon auch in der zweiten PCR untersucht. Diese entspricht der Tape-Measure-PCR, welche auch zum Nachweis von Phagen in Kulturüberständen angewandt wurde und ergibt nur ein Produkt, wenn der Phage definitiv im Bakteriengenom enthalten ist.

Verwendete Primer:

- Sequenz des Primers #77: '3- AAGTAACCGCCAACACCCCG -5'

- Sequenz des Primers #78: '3- TATGTTGGCGCAGTCGAGGGTT -5'
- Sequenz des Primers #81: '3- GGGTTGCAGACCTTCCTGACTGCTGGTG -5'
- Sequenz des Primers #82: '3- CAACCGGGAACGCCAAAA CAAGAATGAC -5'

### 3.10.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

PCR-Amplifikate wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurde Agarose 1%-ig in 1x TAE-Puffer (pH 8,3) durch Aufkochen gelöst und in Schlitten mit 8- oder 15-zähligen Kämmen gegossen und für mindestens 15 min polymerisiert. Das Gel wurde dann in eine Elektrophorese-Kammer gegeben und mit 1x TAE-Puffer übergossen bis die Kammer gefüllt war. Die PCR-Ansätze sowie Größenstandards (DNA Leiter 1 kb und 100 bp plus) konnten dann direkt in die Geltaschen pipettiert werden. Der Thermo Scientific DreamTaq-Green-Mastermix, welcher ausschließlich zum Einsatz kam, enthält bereits Glycerin zum Beschweren der Proben. Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei 100 V für mindestens 60 min, bis die blaue Lauffront die untere Kante des Gels erreichte. Das Gel wurde dann für 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (Endkonz. 1 µg ml<sup>-1</sup>) gefärbt und für 10 min in rH<sub>2</sub>O entfärbt. Das Gel wurde abschließend unter UV-Licht fotografiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Phagenproduktion im Bioreaktor

Die OD-Messung der Vorkultur ergab einen Wert von 3,4. Die Fermentation wurde nach knapp 27 h beendet und die Kulturbrühe wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben geerntet. Die Probenahme unmittelbar davor lieferte einen OD-Wert von 6,74 und eine LKZ von  $4,6 \cdot 10^9$  KBE ml<sup>-1</sup>. Abbildung 3 ist die Aufnahme der Kultur nach 24 h im Phasenkontrastmikroskop. In der anschließenden CsCl-Dichtegradienten-Ultrazentrifuga-

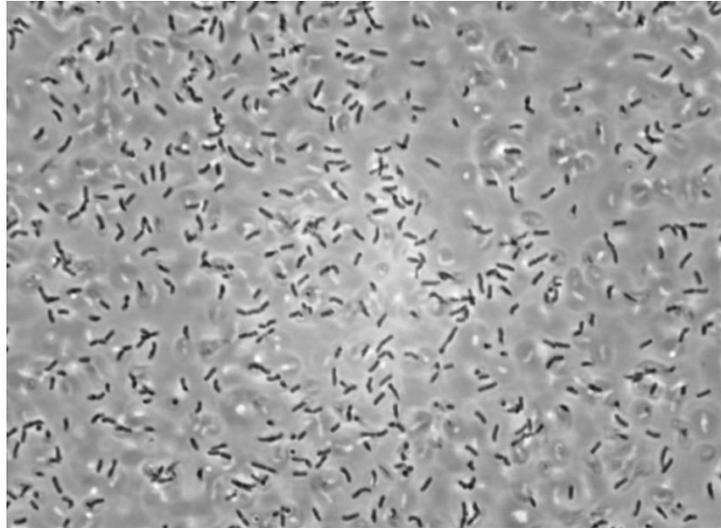


Abbildung 2: Aufnahme der 24 h Kultur des *B. thermophilum* 94004 im Bioreaktor mit einem Phasenkontrastmikroskop (630fache Vergrößerung).

tion konnte eine sichtbare bläuliche Bande im Bereich von  $\rho \sim 1,45$  kg l<sup>-1</sup> mit einer Kanüle abgezogen und in SM-Puffer (s. Tab. 6) aufgenommen und bei 4 °C gelagert werden. Der durch MFCS 3.0 dargestellte Kultivierungsverlauf findet sich im Anhang (s. Abb. 16).

### 4.2 Transmissionselektronenmikroskopie des Bakteriophagen

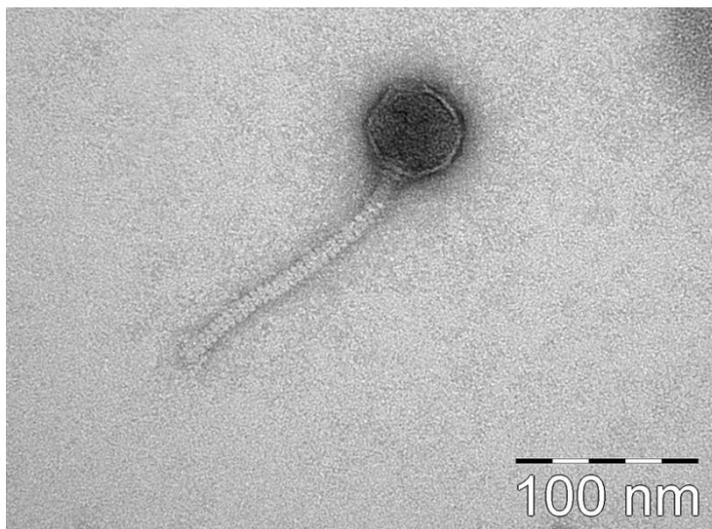


Abbildung 3: TEM-Aufnahme des aktiven Bakteriophagen aus *B. thermophilum* 94004.

Abbildung 4 zeigt die TEM-Aufnahme des Bakteriophagen „Willi“. Anhand dieser lässt sich der Phage morphologisch beschreiben. Er ist gekennzeichnet durch einen flexiblen, langen und nicht kontraktilen Schwanz und konnte mit diesen Informationen mittels der Klassifizierung von Phagen, welche 1974 entwickelt wurde, der Phagenfamilie der *Siphoviridae* zugeordnet werden. (Ackermann *et al.*, 1974). Mithilfe der TEM-Auswertungsssoftware konnte der Phage sehr genau vermessen werden.

Abbildung 4 zeigt die TEM-Aufnahme des aktiven Bakteriophagen aus *B. thermophilum* 94004.

Tabelle 6: Morphologiedaten des Phagen „Willi“, ermittelt aus mehreren Aufnahmen des TEM.

Statistische Größe	Messergebnisse <i>in nm</i>		
	Kopfdurchmesser	Schwanzlänge	Schwanzbreite
Durchschnitt	58,881	148,392	11,168
Min.	57,025	143,662	10,761
Max.	60,359	152,201	11,618

### 4.3 Analyse des Wirtsspektrums des Phagen „Willi“

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Aufnahme des Wirtsspektrums von „Willi“ auf 22 *B. adolescentis* Stämmen aus der hausinternen Stammsammlung zu sehen. Verwendet wurden Phagenlysate aus Cäsiumchlorid-Aufreinigungen (s. Kap. 3.4.2), die in dieser Arbeit (Phagenlysat 1) und in Vorarbeit (Phagenlysat 2) hergestellt wurden. Die Bewertung der Spotbildung und damit Lyse der Zellen durch Phagenaktivität reichte von keiner erkennbaren Spotbildung (-) bis gut erkennbarer Spotbildung (+++); wobei die Anzahl der Pluszeichen für verschiedene Stufen der Erkennbarkeit steht.

Tabelle 7: Ergebnisse der Analyse des Wirtsspektrums von „Willi“ auf 22 *B. adolescentis* Stämmen.

<i>B. adolescentis</i> Stamm- Nummer	Spotbildung	
	Phagenlysat 1	Phagenlysat 2
94005	-	-
94072	++	+++
94081	+	++
94109	-	-
94112	-	++
94174	-	-
94175	-	-
94188	-	-
94189	-	-
94190	+	+
94191	-	+
94192	-	-
94193	-	-
94194	-	+
94195	-	-
F017 A3	-	-
F022 B4	-	-

<i>B. adolescentis</i> Stamm- Nummer	Spotbildung	
	Phagenlysats 1	Phagenlysats 2
F049 B1	-	-
F084 C1	+	+
PS001 B	-	-
PS001 C	-	-
PS105 B	-	-



Während bei einigen Stämmen (94190, 94191, 94194 und F084 C1) sehr feine Spots beobachtet werden konnten, zeigten nur drei Stämme (94072, 94081 und 94112) deutlich erkennbare Spotbildung.

Auf der Abbildung links ist die Spotbildung von *B. adolescentis* 94072 zu sehen. Innerhalb des Spots sind keine Kolonien gewachsen und auch direkt neben dem Spot verbleiben die Kolonien sehr klein.

Abbildung 4: Aufnahme der *B. adolescentis* 94072 Kultur in TPY-Soft-Agar nach Aufspalten des Phagenlysats 2 und 24 h Inkubation.

#### 4.4 Genomsequenzierung des *B. thermophilum* Stammes 94004 und des Phagen

Nachdem die Rohdaten der Sequenzierung der Genome und Gene (16S rRNA) mittels ILLUMINA MiSeq ausgewertet, d. h. assembliert und annotiert waren, erfolgte eine Analyse des 16S rRNA-Gens des *B. thermophilum* 94004 mittels des Basic Local Alignment Search Tool für Nucleotide (BLASTn, NCBI), um eine Aussage über Verwandtschaften mit anderen Bakterien treffen zu können. Das 1487 bp große Gen konnte als „Small Subunit Ribosomal RNA; ssuRNA; SSU rRNA“ nach der Annotation (RAST) im Genom identifiziert und über das BLASTn in die Datenbank gegeben werden. Ein Teil der Ergebnisse dieser Analyse findet sich in Tabelle 8 und ergab *Bifidobacterium thermophilum* RBL67 als ersten Treffer mit einer Abdeckung von 100% und einer Identität von 99% auf 16S rRNA-Genebene. Beispielhaft sind weitere Treffer aufgeführt, deren prozentuale Übereinstimmung allerdings geringer war. BLASTn gibt prozentuale Werte für die Übereinstimmung von gefundenen Sequenzen an. Das prozentuale Ergebnis des direkten Größenvergleichs der hochgeladenen Sequenz mit der in der Datenbank gefundenen

Übereinstimmung steht dabei für die Abdeckung. Die Identität beschreibt die Gleichheit einzelner übereinstimmender Abschnitte der verglichenen Sequenzen. Beispielsweise würden zwei Sequenzen eine 100%ige Identität aufweisen, wenn nur ein sehr kleiner Abschnitt der kompletten Sequenz übereinstimmt, in diesem kleinen Bereich aber alle Basenpaare gleich sind.

Tabelle 8: Ausschnitt der Ergebnisse der BLASTn-Analyse des *B. thermophilum* 94004 Stammes auf 16S-rRNA-Ebene.

Gefundene Sequenz	Abdeckung	Identität
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> RBL67, complete Genome	100 %	99 %
<i>Bifidobacterium thermacidophilum subsp. porcinum</i> , gene for 16S rRNA, partial sequence	99 %	99 %
<i>Bifidobacterium sp. JCM 7042</i> , gene for 16S rRNA, partial sequence	97 %	100 %

Im nächsten Schritt wurden dann die assemblierten Contigs (s. Kap. 3.7.2) des sequenzierten *B. thermophilum* 94004 einzeln über BLASTn in die Datenbank geladen und analysiert. Es zeigte sich, dass das Contig 14 eine etwa 40 kb große DNA-Sequenz enthält, die in dem Genom von *B. thermophilum* RBL67 an dieser Stelle nicht vorkommt (s. Abb. 7, Tab. 9).

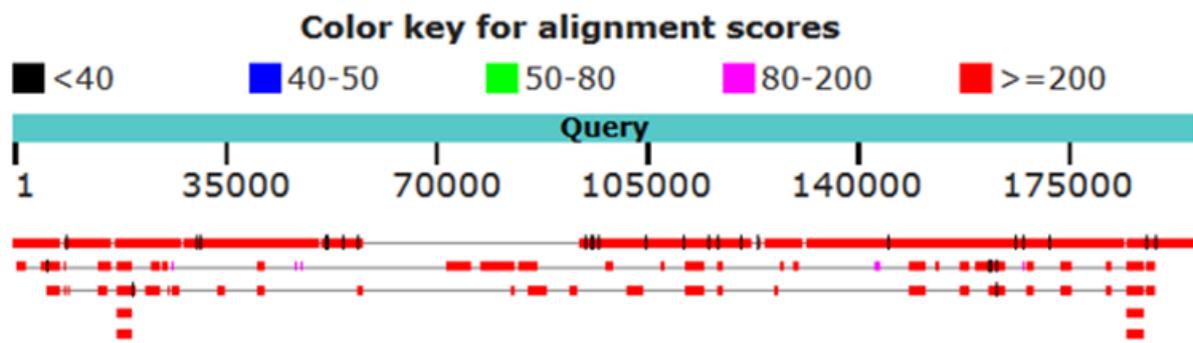


Abbildung 5: Graphische Darstellung der BLASTn-Ergebnisse des Contig 14 des *B. thermophilum* 94004 Stammes.

Tabelle 9: Darstellung der BLASTn-Ergebnisse des Contig 14 des *B. thermophilum* 94004 Stammes.

Gefundene Sequenz	Abdeckung	Identität
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> RBL67, complete genome	100 %	99 %
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> strain BBMN23, complete genome	27 %	87 %
<i>Bifidobacterium bifidum</i> S17, complete genome	23 %	94 %
<i>Bifidobacterium sp. CFAR 172</i> xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase (xfp) gene, complete cds	1 %	97 %
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703 DNA, complete genome	21 %	92 %

Aufgrund der Vermutung, dass hier der Prophage im Genom integriert ist, wurde das Contig 14 mittels PHAST (PHAge Search Tool, Zhou *et al.*, 2011) analysiert (s. Abb. 7). Position 1 und 27 zeigen die attachment-sites *attL* und *attR*, die das PHAST-Programm aufgrund von Sequenz-

## Ergebnisse

Homologien gefunden hat. Die zwischen diesen Regionen liegenden ORFs wurden durch PHAST annotiert und mit BLAST analysiert. Die in grün dargestellten Gene sind Phagen-spezifische Gene, die in grau dargestellten Gene Bakterien-spezifische Gene. Unter den Phagen-spezifischen Genen, die für essentielle Proteine codieren, wurden ein Capsid-Reifungsprotein (Position 7), ein Kopfmorphogenese-Protein (Position 12), ein die Schwanzlänge bestimmendes Tape-Measure-Protein (Position 19), ein Antirepressor-Protein (Position 10) und eine Integrase (Position 26) gefunden. Eine graphische Darstellung des Contig 14 findet sich im Anhang (s. Abb. 20).

#	CDS_POSITION	BLAST_HIT	E-VALUE
1	57869..57914	atll AACGTTGCAATCGCGCGTTTTTGAATGCACGGAAACAGGCCGTTTC	0.0
2	71550..71957	PHAGE_Lactoc_50101_NC_031040: hypothetical protein; PP_00074; phage(gi100027)	2e-14
3	complement(72068..72307)	hypothetical; PP_00076	0.0
4	72294..72512	hypothetical protein Blon_1810 [Bifidobacterium longum subsp. infantis ATCC 15697 = JCM 1222 = DSM 20088]. gi213692677/ref/YP_002323263.1; PP_00075	7e-11
5	72505..73923	PHAGE_Arthro_vB_ArS_ArV2_NC_022972: terminase; PP_00077; phage(gi563398113)	4e-98
6	73923..75437	PHAGE_Gordon_Lucky10_NC_031267: hypothetical protein; PP_00078; phage(gi1000003)	5e-49
7	75563..76864	PHAGE_Mycoba_Bernal13_NC_024135: capsid maturation protease; PP_00079; phage(gi640883692)	4e-05
8	76861..77178	hypothetical; PP_00080	0.0
9	77348..77962	PHAGE_Mycoba_WIVsmall_NC_021334: hypothetical protein; PP_00081; phage(gi509141080)	5e-19
10	77990..78877	PHAGE_Mycoba_Sneeze_NC_031102: kila anti-repressor protein; PP_00082; phage(gi1000007)	2e-43
11	78886..79245	hypothetical; PP_00083	0.0
12	79248..79646	PHAGE_Lactoc_63301_NC_031017: putative head morphogenesis protein; PP_00084; phage(gi100034)	5e-07
13	79646..79969	hypothetical protein BBIF_0099 [Bifidobacterium bifidum S17]. gi310286620/ref/YP_003937878.1; PP_00085	7e-19
14	79972..80208	hypothetical; PP_00086	0.0
15	80205..80603	hypothetical protein BBIF_0101 [Bifidobacterium bifidum S17]. gi310286622/ref/YP_003937880.1; PP_00087	8e-18
16	80670..81269	hypothetical protein BBIF_0102 [Bifidobacterium bifidum S17]. gi310286623/ref/YP_003937881.1; PP_00088	2e-51
17	81357..81737	hypothetical; PP_00089	0.0
18	81884..82087	hypothetical; PP_00090	0.0
19	82130..84892	PHAGE_Propio_PHL114L00_NC_022340: putative tape measure protein; PP_00091; phage(gi543171554)	1e-102
20	84879..85706	hypothetical protein BBIF_0106 [Bifidobacterium bifidum S17]. gi310286627/ref/YP_003937885.1; PP_00092	2e-138
21	85697..87325	PHAGE_Pectob_My1_NC_018837: YadA domain-containing protein; PP_00093; phage(gi410491156)	8e-07
22	87337..87570	hypothetical protein BBIF_0108 [Bifidobacterium bifidum S17]. gi310286629/ref/YP_003937887.1; PP_00094	4e-38
23	87572..88366	hypothetical protein BBIF_0109 [Bifidobacterium bifidum S17]. gi310286630/ref/YP_003937888.1; PP_00095	2e-92
24	88387..88662	hypothetical; PP_00096	0.0
25	complement(88771..89013)	hypothetical protein BLIF_1077 [Bifidobacterium longum subsp. infantis 157F]. gi322689263/ref/YP_004208997.1; PP_00097	1e-14
26	complement(89096..89968)	PHAGE_Clostr_CDMH1_NC_024144: putative integrase protein; PP_00098; phage(gi640884898)	7e-17
27	94430..94475	atr AACGTTGCAATCGCGCGTTTTTGAATGCACGGAAACAGGCCGTTTC	0.0

Abbildung 6: Tabellarische Ergebnisse der BLASTn-Analyse des Contig 14 aus dem Genom des *B. thermophilum* 94004 Stammes.

Auch das sequenzierte Phagen-genom wurde mittels BLASTn analysiert. Es zeigte sich, dass diese Sequenz bisher noch nicht für einen Phagen beschrieben bzw. in die Datenbank geladen wurde. Das Phagen-genom weist eine ungefähre Größe von 36,5 kb auf.

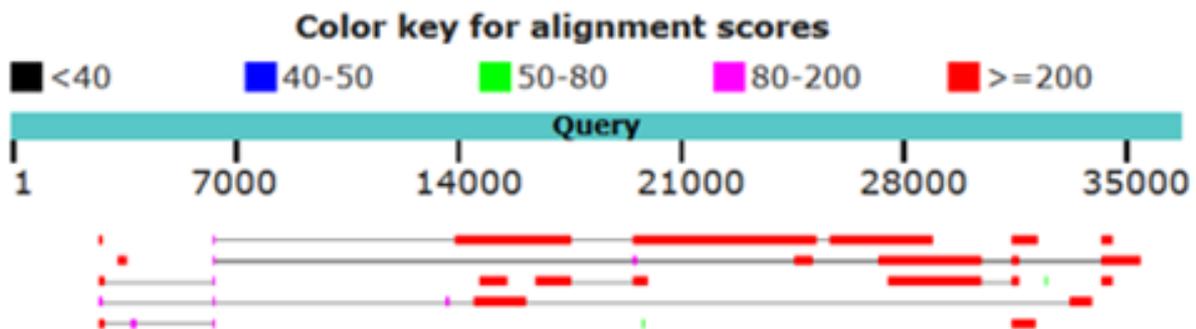


Abbildung 8: Graphische Darstellung der BLASTn-Ergebnisse des sequenzierten Phagen-genoms.

Tabelle 10: Darstellung der BLASTn-Ergebnisse des sequenzierten Phagen-genoms.

Gefundene Sequenz	Abdeckung	Identität
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> strain BBMN23, complete genome	34 %	87 %
<i>Bifidobacterium bifidum</i> S17, complete genome	14 %	94 %
<i>Bifidobacterium bifidum</i> strain PRI 1 chromosome, complete genome	8 %	94 %
Uncultured bacterium clone Control TwinB Time 2 PE 119 genomic sequence	4 %	97 %
<i>Bifidobacterium longum</i> strain Su859 genome assembly, chromosome: I	2 %	91 %

Im Anhang (s. Abb. 18, Abb. 19) sind Bilder aufgeführt, die eine Übersicht der assemblierten und annotierten Genome des *B. thermophilum* 94004 und des Phagen „Willi“ darstellen.

## 4.5 Induktionsversuche des Prophagen

Dargestellt werden die OD-Kurven von *B. thermophilum* 94004 nach Behandlung mit verschiedenen MMC-Konzentrationen.

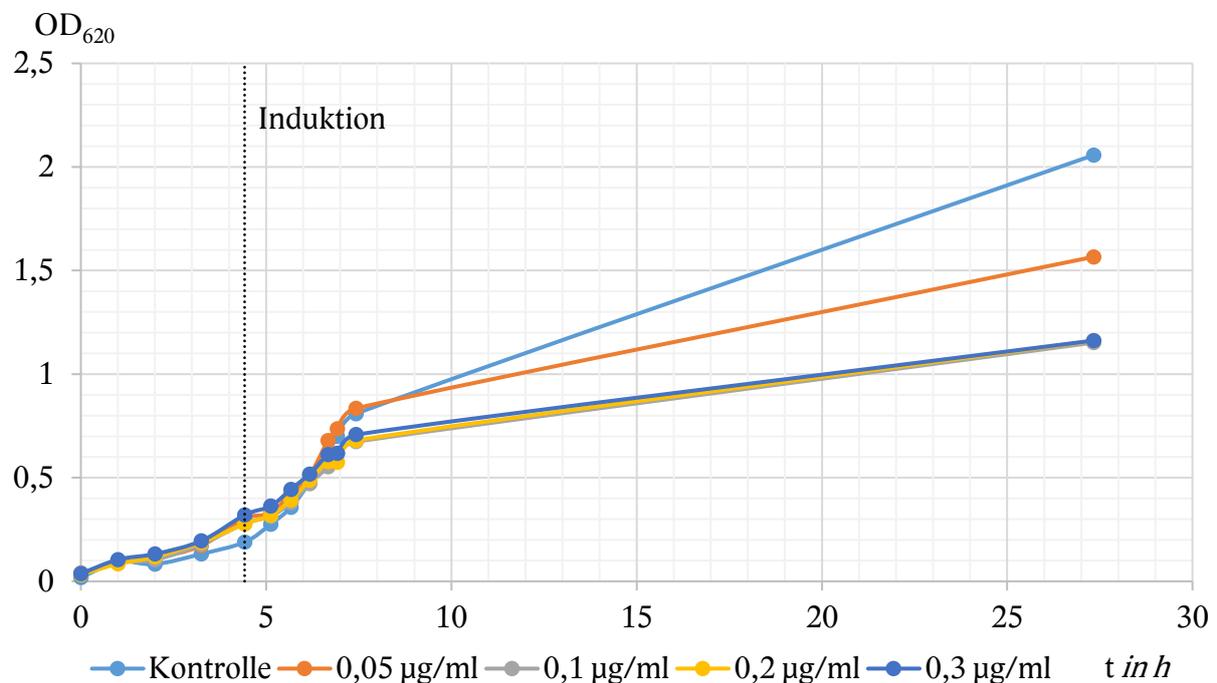


Abbildung 7: Induktionsversuch von *B. thermophilum* 94004 mit MMC-Konzentrationen von 0,05 bis 0,3 µg ml<sup>-1</sup>. Die Induktion erfolgte nach 4,4 h.

In Abbildung 9 und Tabelle 11 ist zu sehen, dass die Kulturen ähnliche Start-OD-Werte aufwiesen und bis zur Messung nach etwa 7,5 h ähnliche exponentielle Wachstumsverläufe zeigten.

Die Messungen am Folgetag ergaben OD-Endwerte, die in der Diskussion für einen Vergleich dienen. Während die Kontrolle den höchsten End-OD-Wert zeigte, nahmen die Endwerte der anderen Kulturen mit zunehmender MMC-Konzentration ab.

Tabelle 11: Start- und End-OD-Werte der Kulturen, die mit 0,02 bis 0,05  $\mu\text{g ml}^{-1}$  MMC induzierten wurden.

MMC-Induktions-Konzentration in $\mu\text{g ml}^{-1}$	Start-OD	End-OD
0 (Kontrolle)	0,018	2,057
0,02	0,033	1,566
0,03	0,042	1,152
0,04	0,032	1,161
0,05	0,037	1,162

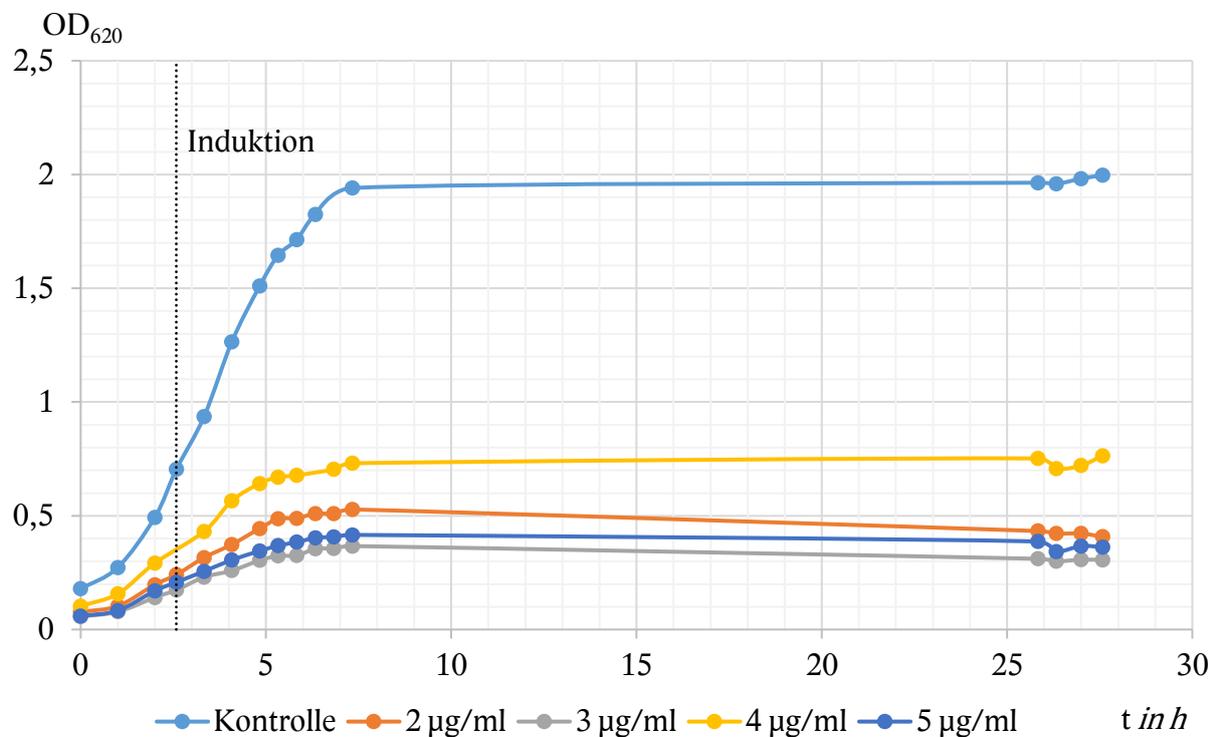


Abbildung 8: Induktionsversuch von *B. thermophilum* 94004 mit MMC-Konzentrationen von 2 bis 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Die Induktion erfolgte nach 2,6 h.

Auffällig in Abbildung 10 ist der ungleiche Verlauf der OD-Werte der Kulturen vor der Induktion. Die Wachstumskurve der Kontrolle kann exponentiellem Wachstum zugeordnet werden, wobei nach 5 h ein anfänglicher Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit zu erkennen ist. Bei den induzierten Kulturen ist nach der Induktion ein Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit zu verzeichnen und die gemessenen OD-Werte verbleiben deutlich unter denen der Kontrolle. Die Messungen der OD am Folgetag zeigten, dass das Wachstum bereits am Vortag abgeschlossen war. Bis auf die Kultur, welche mit 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  MMC induziert wurde (gelb), zeigten die induzierten Kulturen einen minimalen Abfall der OD nach der Übernachtphase bei 37 °C.

Tabelle 12: Start- und End-OD-Werte der Kulturen, die mit 2 bis 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  MMC induzierten wurden.

MMC-Induktions-Konzentration in $\mu\text{g ml}^{-1}$	Start-OD	End-OD
0 (Kontrolle)	0,179	1,997
2	0,077	0,408
3	0,057	0,306
4	0,103	0,764
5	0,059	0,362

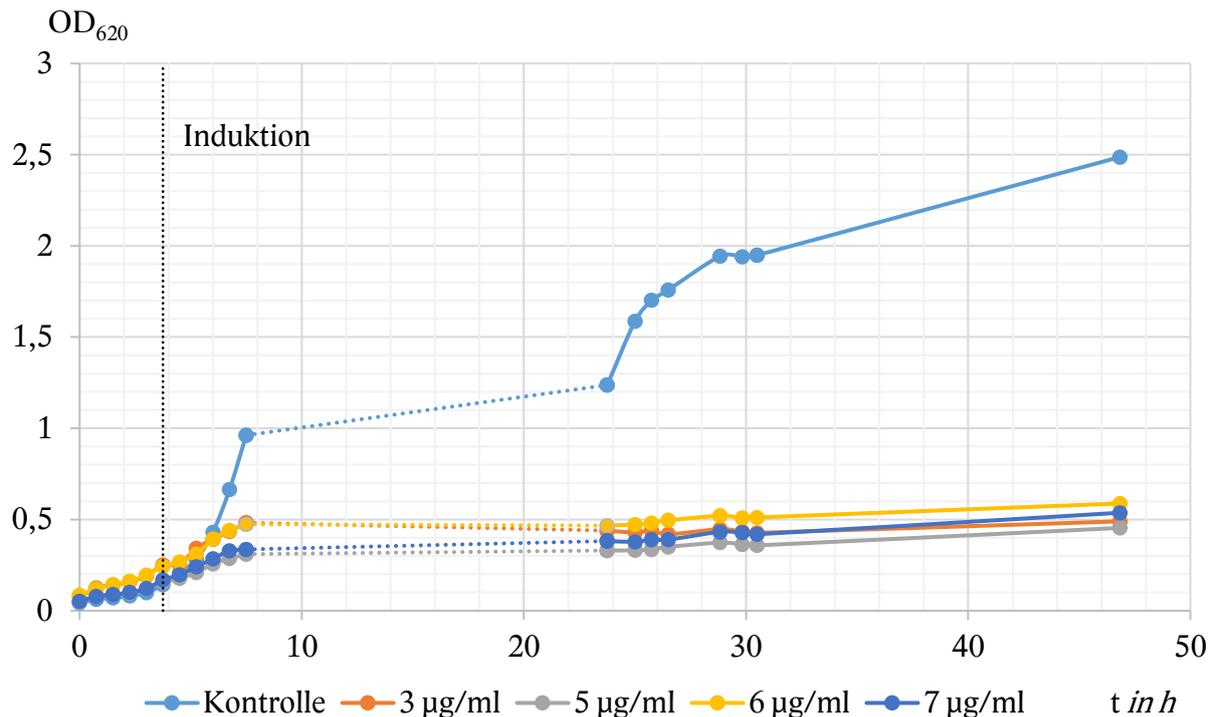


Abbildung 9: Induktionsversuch von *B. thermophilum* 94004 mit MMC-Konzentrationen von 3 bis 7  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Die Induktion erfolgte nach 3,75 h.

Die Kulturen dieses Induktionsversuches zeigten vergleichbare Start-OD-Werte und Wachstumskurven vor der Induktion bei 3,75 h. Nach der Induktion wurde bei den induzierten Kulturen ein Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt, während die Kontrolle bis zu einem OD-Wert von 0,962 exponentiell weitergewachsen ist. Die gepunkteten Linien stellen die Übernachtsphase bei 4 °C dar. Gut zu sehen ist, dass die Kontrolle ihr exponentielles Wachstum am nächsten Tag aufgenommen hat, jedoch nach einer halben Stunde langsamer und nach 29 h nicht mehr gewachsen ist. Die induzierten Kulturen zeigten am zweiten Tag keine Zunahme der OD. Die Endwerte am letzten Tag zeigten eine signifikante Zunahme der OD der Kontrolle, während die induzierten Kulturen weiterhin stagnierten. Die Kulturüberstände der induzierten Kulturen wurden nach Abschluss der Versuche in einer PCR (s. Kap. 3.10.1) auf freigesetzte Phagen untersucht, ergaben allerdings in keinem Fall ein positives Ergebnis.

Tabelle 13: Start- und End-OD-Werte der Kulturen, die mit 3 bis 7  $\mu\text{g ml}^{-1}$  MMC induzierten wurden.

MMC-Induktions-Konzentration in $\mu\text{g ml}^{-1}$	Start-OD	End-OD
0 (Kontrolle)	0,042	2,487
3	0,075	0,490
5	0,047	0,454
6	0,085	0,588
7	0,051	0,537

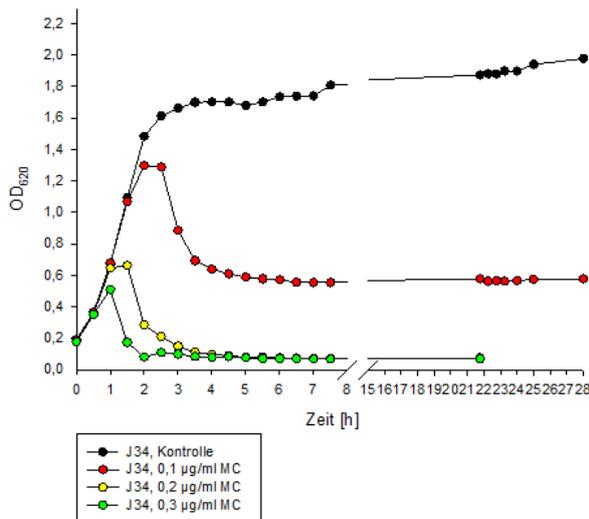


Abbildung 10: Ergebnisse des Kontrollversuchs zur Überprüfung der Wirksamkeit des MMCs mit *Streptococcus thermophilus* J34. Induktionskonzentrationen von 0,1 bis 0,3  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Die OD fällt danach auf ein Minimum (bei 0,2 und 0,3  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) und im Falle der mit 0,1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  MMC induzierten Kultur auf 0,6 zurück. Der Beweis, dass die lysierende Wirkung der Bakteriophagen und nicht die antibiotische Wirkung des MMCs der Grund für den Abfall der OD ist, kann durch eine TEM-Aufnahme des Kulturüberstandes oder eine Titerbestimmung der Phagenkonzentration durch Plaque-Tests erbracht werden.

In Anbetracht der begrenzten Zeit für die Ausarbeitung dieser Arbeit konnte kein Kontrollversuch für die Induktion von *B. thermophilum* 94004 mit UV-Licht durchgeführt werden. Aus diesem Grund konnte nicht bewiesen werden, dass die angewandte Methodik für die Induktion von Prophagen mit UV-Licht geeignet ist und es werden keine Ergebnisse dargestellt. Es kann jedoch erwähnt werden, dass bei den induzierten Kulturen eine Verzögerung des Wachstums erwirkt wurde. Jedoch kann daraus nicht geschlossen werden, dass dieser Effekt auf die Bestrahlung zurückzuführen ist, da die Zellen ebenfalls erhöhtem Stress durch Sauerstoffkontakt ausgesetzt waren. Am Ende erreichten die induzierten Kulturen OD-Werte, die der Kontrolle ähnelten. Die trotz dessen durchgeführte PCR-Analyse der Kulturüberstände ergab ebenfalls kein positives Ergebnis.

Um zu zeigen, dass mit dem verwendeten MMC tatsächlich Prophagen induziert werden können, hat Frau Dr. S. Koberg ein Kontrollversuch mit *Streptococcus thermophilus* J34 durchgeführt.

Die Darstellung der OD-Werte beginnt nach der Induktion mit MMC. Am Anfang verlaufen die OD-Kurven parallel zu der Kontrolle. Mit zunehmender Konzentration des MMCs beginnt der Abfall der OD signifikant früher: bei 0,1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (rot) nach 2 h, bei 0,2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (gelb) nach 1,5 h und bei 0,3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (grün) nach 1 h.

## 4.6 Isolierungsversuche einer Prophagen-kurierten Variante

In diesem Teil werden relevante Informationen und Ergebnisse sowie beispielhafte PCR-Analysen aus dem Versuch zur Isolierung eines Prophagen-kurierten Klons von *B. thermophilum* 94004 dargestellt.

Bevor das eigentliche Screening von einzelnen Klonen durchgeführt wurde, erfolgte eine PCR-Analyse (No-Willi) der aufgereinigten DNA der Gesamtkultur, die aus der Kultivierung zur Phagen-Produktion gewonnen wurde. Dabei kamen beide Primer-Paare zum Einsatz (s. Kap. 3.10.4).

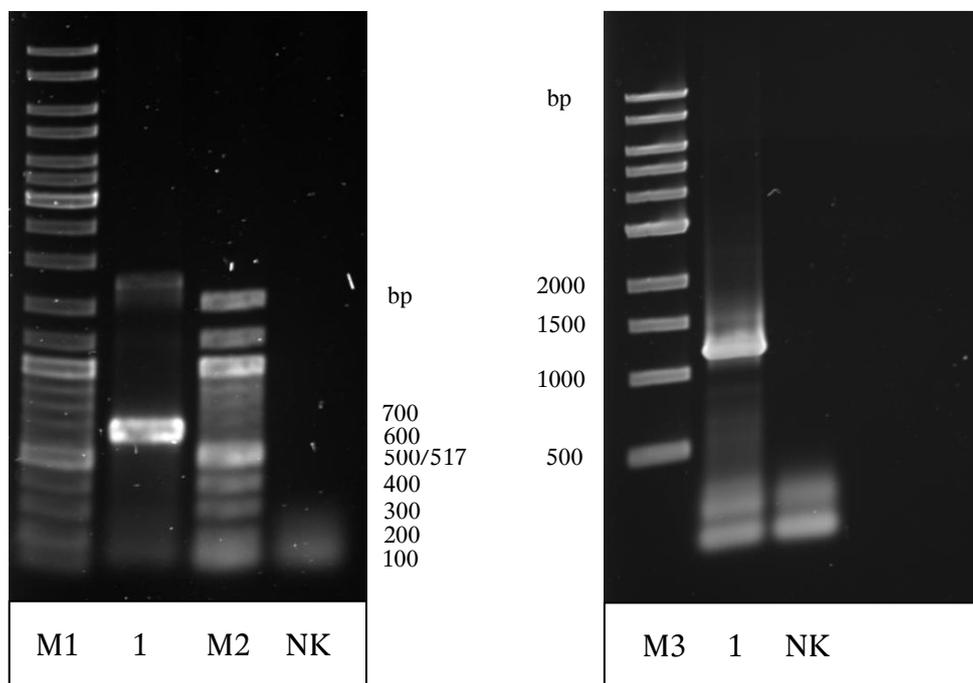


Abbildung 11: Aufnahmen der Elektrophorese-Gele mit den gelaufenen Produkten aus den No-Will-PCRs mit den Primern #77 + #78 (links) und #81 + #82 (rechts).

Beide PCR-Analysen ergaben eine Bande erwarteter Größe (links: ~600 bp, rechts: ~1150 bp). Demnach konnte davon ausgegangen werden, dass die Gesamtkultur Klone enthielt, die Prophagen-kuriert waren oder noch nicht infiziert worden sind.

Insgesamt wurden 60 isolierte Klone auf Prophagen-Kurierung untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse der zweistufigen PCR-Analyse von 30 isolierten Klonen abgebildet.

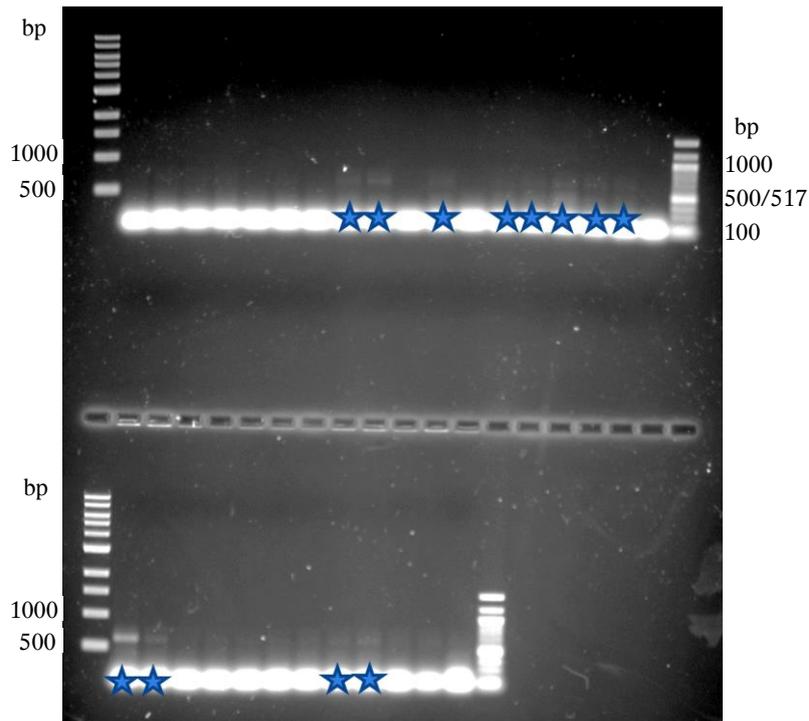


Abbildung 12: Ergebnisse der No-Willi-PCR von 30 isolierten Klonen aus der Gesamtkultur von *B. thermophilum* 94004. Erkennbare Banden bei ~600 bp. Blaue Sterne kennzeichnen Klone, die Prophagen-kuriert sein könnten. Verwendete Primer: #81 & #82

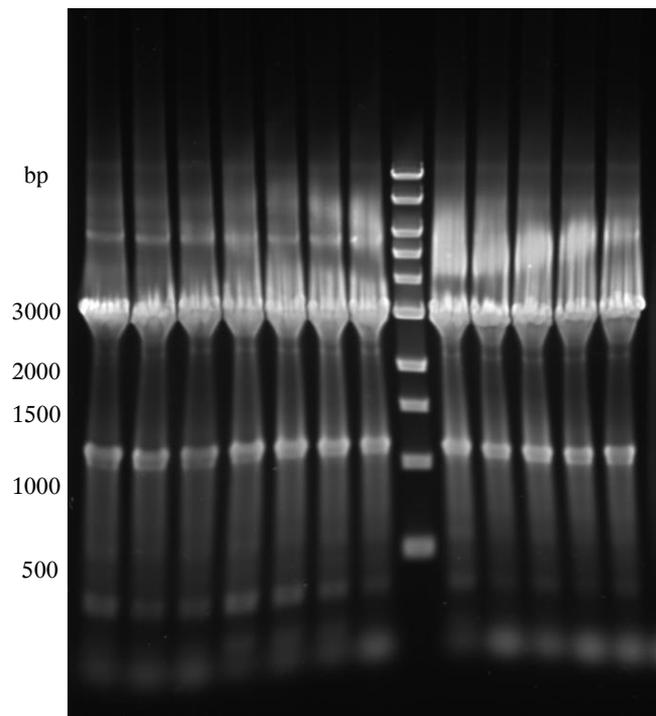


Abbildung 13: Ergebnisse der Tape-Measure-PCR von potenziell Prophagen-kurierten Klonen.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der No-Willi-PCR mit 30 Klonen von *B. thermophilum* 94004. Die Sterne kennzeichnen Klone, bei denen eine mindestens schwach erkennbare Bande bei ~600 bp gelaufen ist. Die zweite PCR (Tape-Measure) ergab für alle gekennzeichneten Klone Banden bei ~1200 bp und ~3000 bp.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Bakteriophage „Willi“, der bei der Kultivierung des lysogenen *Bifidobacterium thermophilum* 94004 erstmals entdeckt wurde, morphologisch und molekularbiologisch analysiert. Die in Kapitel 4 dargestellten Ergebnisse dienen nunmehr als Diskussionsgrundlage.

Die Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens von *Bifidobacterium* 94004 lieferte erstmals die Information, dass es sich dabei um ein *Bifidobacterium thermophilum* handeln könnte, da eine hohe Übereinstimmung (Abdeckung 100 %, Identität 99 %) mit *B. thermophilum* RBL67 festgestellt wurde (Tab. 8). Dieses Bifidobakterium wurde erstmals aus Stuhlproben von Säuglingen isoliert (Touré *et al.*, 2003). Nach der Sequenzierung des *B. thermophilum* RBL67 Genoms wurde dieses auch veröffentlicht (Jans *et al.*, 2013). Der direkte Vergleich mit dem Genom von 94004 auf Sequenzebene konnte bestätigen, dass es sich um ein *B. thermophilum* handelt, welches dem *B. thermophilum* RBL67 sehr ähnlich ist. Die ca. 40 kb große Sequenz in Contig 14 des *B. thermophilum* 94004, die im Genom von *B. thermophilum* RBL67 fehlt, stellte sich nach einer PHAST-Analyse als Prophagenom heraus (s. Abb. 6, Tab. 9). Ein Abgleich dieser Sequenz mit dem sequenzierten Genom des freien Phagen zeigte eine eindeutige Übereinstimmung. Des Weiteren wurden in dem Prophagen-Genom Phagen-spezifische Strukturproteine für Capsid-Reifung, Kopfmorphogenese und das Tape-Measure-Protein identifiziert. Für die lysogene Vermehrungsweise des temperenten Phagen „Willi“ wurden unerlässliche Proteine wie ein Antirepressor und eine Integrase gefunden. Zu diesem Zeitpunkt stand fest, dass „Willi“ ein temperenter Phage ist. Bei den gefundenen attachment-sites handelt es sich um die Bereiche, an denen die homologe Rekombination zwischen dem bakteriellen Genom und dem temperenten Phagen stattgefunden hat. Auf diese Weise hat sich der Phage in das Bakteriengenom integriert. Letztlich konnte ein BLASTn-Abgleich des Phagenoms zeigen, dass lediglich geringe Sequenz-basierte Übereinstimmungen mit anderen Bifidobakterien-Genomen gefunden wurden (s. Abb. 8, Tab. 10). Damit stellt der in dieser Arbeit isolierte und charakterisierte Phage „Willi“ einen neuen temperenten Phagen von *B. thermophilum* dar.

Bei der Kultivierung des *B. thermophilum* 94004 im Bioreaktor lagen die ermittelten Endwerte für optische Dichte (6,74) und Lebendkeimzahl ( $4,6 \cdot 10^9$  KBE ml<sup>-1</sup>) im Vergleich mit Kultivierungen, die vor dieser Arbeit unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, im Mittelfeld der Ergebnisse (s. Anhang Tab. 19). Das könnte auf eine erhöhte lytische Aktivität von Phagen hinweisen. Die Nachweisgrenze für Phagen bei der Aufnahme im Transmissionselektronenmikroskop liegt bei ungefähr  $10^6$  PbE ml<sup>-1</sup>. Die Tatsache, dass freie Phagen im Kulturüberstand der Bioreaktor-Probe gefunden werden konnten, deutete auf eine Konzentration der Phagen im Be-

reich der Nachweisgrenze hin. Die Kultivierung von *B. thermophilum* 94004 im Bioreaktor erwies sich als einzige Kultivierungsumgebung, in der sich freie Phagen nachweisen ließen. Das könnte für eine hohe spontane Induktionsrate oder eine durch die Bedingungen des Bioreaktors hervorgerufene Induktion des Prophagen sprechen. Im Unterschied zur Kultivierung im Anaerobiertopf oder Hungate-Röhrchen wird im Bioreaktor ab dem Erreichen eines voreingestellten pH-Wertes NaOH zugegeben und der Fermenterinhalt gerührt, wodurch eine höhere Zelldichte erreicht werden kann. Es gibt zahlreiche intrinsische und extrinsische Faktoren, die einen Prophagen induzieren können (Nanda *et al.*, 2015). Zu den extrinsischen Faktoren zählen z. B. UV-Strahlung, Antibiotika, Hitze und der pH-Wert. Die Vermutung liegt nahe, dass die Änderung des pH-Werts durch NaOH-Zugabe eine Rolle bei der Induktion spielen könnte. Dieser Effekt müsste in nachfolgenden Versuchen im kleinen Maßstab näher analysiert werden.

Der gefundene Phage „Willi“ konnte anhand der TEM-Aufnahme und der Ackermann-Klassifizierung der Phagenfamilie der *Siphoviridae* zugeordnet werden. Die Einordnung erfolgte in Abgrenzung zu *Myoviridae*-Phagen, welche die zweite Phagenfamilie mit langen Schwänzen innerhalb der Ordnung *Caudovirales* darstellen. Diese besitzen durch die Fähigkeit der Kontraktion allerdings einen deutlich dickeren und starren Schwanz (s. Anhang Abb. 17). Bisher sind keine TEM-Aufnahmen von *Bifidobacterium*-Phagen veröffentlicht worden, weshalb kein morphologischer Vergleich zu anderen Phagen gezogen werden konnte.

Die Analyse des Wirtsspektrums von „Willi“ auf 22 verschiedenen *B. adolescentis* Stämmen ergab, dass der *B. adolescentis* Stamm 94072 der empfänglichste Wirtsstamm war. Jedoch kann in diesem Fall nicht eindeutig von einem Indikatorstamm gesprochen werden, zumal die Ergebnisse nicht reproduziert werden konnten. Aufgrund dessen, dass keine Plaques generiert werden konnten, war auch keine genaue Titerbestimmung möglich.

Tabelle 7 zeigt, dass das Phagenlysat 2 in zwei Fällen (94072 und 94081) eine bessere Spotbildung als das Phagenlysat 1 zeigte. Weiterhin erzeugte in drei Fällen (94112, 94191 und 94194) nur das Phagenlysat 2 erkennbare Spots. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass das Phagenlysat 2 einen höheren Phagentiter aufwies. Erfolgreiche Titerbestimmungen stellen eine essentielle analytische Basis bei der Forschung an Bakteriophagen dar. Ohne diese können nur wenige Aussagen darüber getroffen werden, unter welchen Umständen, d. h. Umweltbedingungen für die Wirtszelle, wie viele Phagen freigesetzt werden. Des Weiteren ist sowohl der zeitliche als auch finanzielle Aufwand bei Titerbestimmungen mit Indikatorstämmen im Vergleich zu einer Aufnahme mittels TEM, die in dieser Arbeit zum Nachweis von Phagen diente, deutlich geringer. Zur weiteren Arbeit mit dem *Bifidobacterium thermophilum* 94004 als lysogener Wirt von „Willi“ und dessen Erforschung stellt das Finden eines geeigneten Indikatorstammes somit ein unabdingliches Ziel dar. Bei der Aufnahme des Wirtsspektrums kamen ausschließlich *B. adole-*

*scintis* Stämme zum Einsatz. Diese Spezies weist eine enge Verwandtschaft zu *B. thermophilum* auf. Es sollten allerdings auch Stämme derselben Spezies als Indikatorstämme in Betracht gezogen werden.

In vielen Fällen führt die Infektion eines Bakteriums durch einen temperenten Phagen zum Tod der Zelle durch Lyse. Jedoch werden auch Möglichkeiten beschrieben, wie der Phage den Wirtstamm positiv beeinflussen kann (Harrison *et al.*, 2017). Das Phänomen wird als lysogene Konversion bezeichnet und beruht auf Phagen-kodierten Genen, die den Phänotyp der Wirtszelle beeinflussen können. Im Zuge dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob auch „Willi“ seinen Wirt beeinflusst. Aufschluss darüber könnte ein Vergleich von Kultivierungen mit *B. thermophilum* 94004 und mit einem Prophagen-kurierten Klon geben. Die gezielte Induktion von Prophagen durch Umweltreize kann den Selektionsdruck auf den Wirt erhöhen, sodass Prophagen-kurierte Klone isoliert werden können. In der Literatur sind einige Methoden zur Induktion von Prophagen beschrieben (Lwoff *et al.*, 1953).

Es wurden Induktionsversuche mit Mitomycin C und UV-Strahlung durchgeführt. In keinem dieser Versuche ließ sich der Prophage induzieren (s. Kap. 4.5). Im Falle der UV-Induktion könnte die angewandte Methodik der Grund für das negative Ergebnis sein, da diese in Ermangelung eines Kontrollversuchs nicht bestätigt werden konnte. Aus einer Publikation des Jahres 2005 geht hervor, dass nur einer von zwei behandelten Prophagen in Bifidobakterien mit MMC induziert werden konnte (Ventura *et al.*, 2005). Studien aus 2004 zeigten, dass auch Phagen, welche die Gattung *Lactobacillus* befallen, nicht mit MMC induziert werden konnten (Ventura *et al.*, 2004). Das Ergebnis, dass der Prophage „Willi“ nicht durch MMC induziert wird, bestätigt die Ergebnisse dieser Studien. In der Literatur werden weitere Methoden der Induktion von Prophagen wie z. B. mit Wasserstoffperoxid beschrieben, das die Wirtszelle oxidativem Stress aussetzt (Loś *et al.*, 2010; Ventura *et al.*, 2005). In der weiteren Erprobung der Induzierbarkeit von „Willi“ sollten diese Agenzien getestet werden.

Des Weiteren lassen sich Methodik und Ergebnisse der MMC-Induktion diskutieren. Aufgrund der unterschiedlichen Anfangs-OD-Werte, die beim Beimpfen mit Spritze und Kanüle entstanden sind (s. Tab. 11, 12 und 13), sind die Kulturen von *B. thermophilum* 94004 unterschiedlich schnell gewachsen, sodass der Soll-OD-Wert zur Induktion von 0,2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht wurde. Weiterhin könnte das TPY-Medium in den Hungate-Röhrchen unterschiedliche Verhältnisse von Sauerstoff zu Stickstoff aufweisen; je nachdem wie gut das Begasen und Befüllen der Röhrchen funktioniert hat. Somit würde eine unterschiedlich lange Adaptionsphase der Bakterien an die Bedingungen erklärt werden können. Für zukünftige Induktionsversuche, welche in Hungate-Röhrchen durchgeführt werden sollen, muss eine konsistente Beimpfung der Röhrchen erfolgen, sodass das Wachstum direkt vergleichbar ist. Die End-OD-Werte der induzierten Kulturen zeigen, dass MMC einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen

hat. Mit zunehmender Konzentration von MMC in der Kultur wird das Wachstum stark gehemmt. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da das Antibiotikum MMC als Zytostatikum eine wachstumshemmende Wirkung besitzt (Mitomycine - Lexikon der Biologie).

Im Falle der „No-Willi-PCR“ kamen zwei verschiedene Primer-Paare zum Einsatz. Bei der ersten Generation dieser bindet der Primer #77 sehr nahe upstream der *attL*. Das Herausschneiden des Phagen aus dem Genom erfolgt nicht immer an derselben Stelle, sodass in manchen Fällen angrenzende bakterielle DNA, an die die Primer binden, mit herausgeschnitten würde. In so einem Fall würde die mitisolierte Phagen-DNA in der PCR ein falsch positives Signal geben. Weiterhin hybridisierte der Primer #77 teilweise an einer weiteren Sequenz innerhalb des Bakteriengenoms. Deshalb kam ein zweites Amplifikat zustande, dass bei einer Größe von etwa 1700 bp lief (s. Abb. 13, links). Dies hat zwar keinen Einfluss auf die Amplifizierung des erwünschten Produkts (600 bp), findet aber als Schönheitsfehler Erwähnung. Aus diesen Gründen wurde eine zweite Generation von „No-Willi-Primer“ designt, die genug Abstand zu den attachment-sites des Prophagen einhielten und kein weiteres Amplifikat produzierten. Auch die Primer der „Tape-Measure-PCR“ ergaben ein zweites Amplifikat, dass bei einer Größe von ~1200 bp lief (s. Abb. 15). Da die eingesetzten Primer-Paare beider PCR-Systeme Produkte erwarteter Größe bildeten, kann ausgeschlossen werden, dass die Nachweissysteme nicht funktionierten. Daraus geht hervor, dass bei Klonen, die in der „No-Willi-PCR“ als Phagen-kuriert identifiziert wurden, nach dem Hitzaufschluss sowohl Prophagen-kurierte als auch lysogene Genome oder zumindest Teile des Prophagen-Genoms vorliegen müssten.

In Ermangelung einer Methode zur Induktion von „Willi“ aus dem lysogenen *B. thermophilum* Stamm 94004 konnte auf diese Weise kein Prophagen-kurierter Klon isoliert werden. Die PCR-Analyse der Bioreaktor-Gesamtkultur von *B. thermophilum* 94004 lieferte den Beweis, dass darin Prophagen-kurierte Klone vorhanden waren. Von den 60 untersuchten Klonen zeigten 18 eine Bande in der „No-Willi-PCR“. In der anschließenden „Tape-Measure-PCR“ zur Gegenkontrolle konnte jedoch kein Klon als Phagen-kuriert identifiziert werden, da bei jedem eine Bande erkennbar war, die ein Beweis für das Vorhandensein eines Prophagen war. Aufgrund der inkongruenten Ergebnisse der PCRs in jedem Fall muss ein Fehler in der Methodik vorliegen. Auf den ausgestrichenen Nährböden sind nur wenige Kolonien (weniger als 10 pro Platte) gewachsen, was den Schluss zulässt, dass es sich dabei um Reinkulturen handelt, zumal keine Zellen aggregieren konnten. Dass also sowohl Prophagen-kurierte als auch lysogene Klone in einer Kolonie vorkommen, ist unwahrscheinlich. Der Fehler könnte in dem entwickelten Nachweissystem der „No-Willi- oder Tape-Measure-PCR“ zu finden sein.

Letztlich konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Prophagen-kurierter Klon von *B. thermophilum* 94004 isoliert werden, sodass keine Kultivierung eines solchen durchgeführt werden konnte.

Aus diesem Grund kann über die Einflüsse des Prophagen „Willi“ auf die Physiologie des lysogenen *B. thermophilum* Stammes 94004 keine Aussage getroffen werden. Es kann lediglich durch Vergleich mit dem Wachstumsverhalten bisher getesteter Bifidobakterien vermutet werden, dass der Prophage eine Fitnesssteigerung bewirkt. Eine weitere Möglichkeit, um diese Forschungsfrage zu klären, wäre ein Kultivierungsvergleich mit *B. thermophilum* RBL67. Da die Sequenzierung des Bakteriengenoms von *B. thermophilum* 94004 erst zum Ende dieser Arbeit die Information ergab, dass eine große Ähnlichkeit zu *B. thermophilum* RBL67 besteht, konnte dieser Vergleich nicht mehr durchgeführt werden. Der Stamm wurde allerdings bereits bestellt und wird in der Zukunft einen Kultivierungsvergleich ermöglichen.

## 6 Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Charakterisierung des temperenten Phagen aus dem lysogenen *Bifidobacterium thermophilum* Stamm 94004 können als anfänglich bezeichnet werden. Aufgrund von negativen Ergebnissen in vielen der geplanten Versuche konnten Ziele wie das Finden eines Prophagen-kurierten Klons und dessen Kultivierung nicht umgesetzt werden. Die Phagengewinnung im Bioreaktor konnte reproduziert werden, wenngleich das gewonnene Phagenlysat wahrscheinlich einen geringeren Titer als das Phagenlysat aus der Vorarbeit aufweist. Der Phage konnte aufgrund der Morphologie klassifiziert und der Familie der *Siphoviridae* zugeordnet werden. Die Analyse des Wirtsspektrums des Phagen ergab *Bifidobacterium adolescentis* 94072 als potenziellen Indikatorstamm, welcher allerdings keine Plaques generieren konnte, sodass keine genauen Titerbestimmungen durchgeführt werden konnten. Die Sequenzierung der Genome von Phage und Wirtsstamm zeigte, dass es sich um einen temperenten Phagen handelte. Im Phagengenom wurden Gene gefunden, welche für wichtige Proteine codieren, die essentiell für die Struktur und einen lytischen Zyklus sind. Ein Abgleich mit der NCBI-Datenbank zeigte auf, dass dieser Phage bis dahin nicht veröffentlicht wurde und somit einen neuen temperenten Phagen von *B. thermophilum* darstellte. Induktionsversuche zeigten, dass der Prophage nicht durch Mitomycin C induzierbar ist; *B. thermophilum* 94004 allerdings schon bei geringen Konzentrationen ab  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  im Wachstum gehemmt wird. Es wurden Nachweissysteme mittels PCR entwickelt, mit denen zum einen das Tape-Measure Gen innerhalb des Phagengenoms und zum anderen Prophagen-kurierte Klone identifiziert werden konnten. Anhand der Ergebnisse konnte die Funktionalität der Nachweise bewiesen werden, da die Primer spezifisch binden und die Gelelektrophorese Banden erwarteter Größe aufzeigte. In einem Isolierungsversuch wurde nach einzelnen Prophagen-kurierten Klonen gesucht, die in der Ausgangskultur mittels PCR nachgewiesen wurden. Es konnte jedoch kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden.

## 7 Ausblick

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war das Finden eines Prophagen-kurierten Klons von *Bifidobacterium thermophilum* 94004, um nach dessen Kultivierung eine Aussage über den möglichen Einfluss des Prophagen „Willi“ auf die Physiologie des Wirtsstammes machen zu können. *B. thermophilum* RBL67, der von einer anderen Arbeitsgruppe isoliert wurde, ist dem Stamm 94004 sehr ähnlich und könnte dadurch eine Prophagen-kurierte Variante ersetzen. Anhand des Kultivierungsausgangs könnte dann im Vergleich mit der Wachstumskinetik von 94004 beurteilt werden, ob sich der Prophage vorteilhaft auf die Fitness des Wirtes auswirkt. Der Induktionsversuch des Prophagen mit Mitomycin C blieb erfolglos. UV-Strahlung als Induktion wurde zwar getestet, die angewandte Methode konnte allerdings nicht mit Hilfe einer Kontrolle verifiziert werden und muss weiter optimiert werden. Deshalb sollte dieser Versuch wiederholt und weitere Reagenzien wie Wasserstoffperoxid als induzierendes Agens getestet werden. Da sich der Phage nur in der Bioreaktor-Kultivierungsumgebung freigesetzt hat, lag die Vermutung nahe, dass die Zugabe von NaOH zur Induktion des Prophagen beigetragen hat. Diese Methode könnte auch im kleineren Maßstab wie dem Hungate-System angewendet werden. Um genaue Titerbestimmungen in Phagenlysaten durchführen zu können, ist ein Indikatorstamm unabdingbar. In dieser Arbeit kamen dafür nur *B. adolescentis* Stämme zum Einsatz, weshalb die Analyse von *B. thermophilum* Stämmen und anderen verwandten Stämmen Gegenstand weiterer Untersuchungen sein sollte.

## Literaturverzeichnis

- Ackermann, H. W. und Eisenstark, A. (1974). The present state of phage taxonomy. *Intervirology* **3** (4), S. 201–219.
- Ackermann, H. W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch Virol* **146** (5), S. 843–857.
- Ackermann, H.-W. (2007). 5500 phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* **152** (2), S. 227–243.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. und Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, **9**:75.
- Bergter, F. (1983). Wachstum von Mikroorganismen: Experimente und Modelle, 2. Auflage. *Gustav Fischer Verlag, Jena*. Kap. 2.2, S. 16-24.
- Biavati, B. und Mattarelli, P. (2001). The family *Bifidobacteriaceae*. In: The Prokaryotes (Editors: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. and Stackebrandt, E.). *Springer, New York*. S. 1-70.
- Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriol Rev* **31** (4), S. 230–314.
- Clokie, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V. und Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage* **1** (1), S. 31–45.
- De Man, J. C., Rogosa, M. und Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology* **23** (1), S. 130-135.
- Felis, G. E. und Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of *Lactobacilli* and *bifidobacteria*. *Current Issues in Intestinal Microbiology* **8** (2), S. 44-61.
- Harrison, E. und Brockhurst, M. A. (2017). Ecological and Evolutionary Benefits of Temperate Phage: What Does or Doesn't Kill You Makes You Stronger. *BioEssays* **39** (12).
- Havenaar, R., Ten Brink, B. und Huis in 't Veld, J. H. J. (1992) In: Probiotics: the Scientific Basis (Editor: Fuller, R.). *Chapman & Hall, London*. S. 209-224.
- Hungate, R. E. (1969). Chapter IV: A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. In: Methods of Microbiology (Editors: Norris, J. R. and Ribbons, D. W.). *Academic Press, London*. S. 117-132.

- Imhof, A. und Heinzer, I. (1996). Continuous monitoring of oxygen concentrations in several systems for cultivation of anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **34** (7), S. 1646-1648.
- Jans, C., Lacroix, C., Follador, R. und Stevens, M. J. (2013). Complete genome sequence of the probiotic *Bifidobacterium thermophilum* strain RBL67. *Genome Announcements* **1** (3), e00191–13.
- Leahy, S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F. und van Sinderen, D. (2005). Getting better with *Bifidobacteria*. *Journal of Applied Microbiology* **98** (6), S. 1303-1315.
- Little, J. W., Mount, D. W. und Yanisch-Perron, C. R. (1981). Purified *lexA* protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **78** (7), S. 4199-4203.
- Lwoff, A. (1953). Lysogeny. *Bacteriology Reviews* **17** (4), S. 269-337.
- Mahony, J., Ainsworth, S., Stockdale, S. und van Sinderen, D. (2012). Phages of lactic acid bacteria: the role of genetics in understanding phage-host interactions and their coevolutionary processes. *Virology* **434** (2), S. 143–150.
- McNair, K., Bailey, B. A. und Edwards, R. A. (2012). PHACTS, a computational approach to classifying the lifestyle of phages. *Bioinformatics* **28** (5), S. 614–618.
- Milani, C., Lugli, G.-A., Duranti, S., Turrone, F., Bottacini, F., Mangifesta, M., Sanchez, B., Viappiani, A., Mancabelli, L., Taminiau, B., Delcenserie, V., Barrangou, R., Margolles, A., van Sinderen, D. und Ventura, M. (2014). Genomic encyclopedia of type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Applied and Environmental Microbiology* **80** (20), S. 6290-6302.
- Nanda, A. M., Thormann, K. und Frunzke, J. (2015). Impact of spontaneous prophage induction on the fitness of bacterial populations and host-microbe interactions. *Journal of Bacteriology* **197** (3), S. 410–419.
- O’Callahan, A. und van Sinderen, D. (2016). *Bifidobacteria* and their role as members of the human gut microbiota. *Frontiers in Microbiology* **7**:925.
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F. und van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes & Nutrition* **6** (3), S. 285-306.
- Roy, D. (2001). Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **69** (3), S. 167-182.
- Sambrook, J. F. und Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3. Auflage. *Cold Spring Harbor, New York*.

- Scardovi, V (1986). *Bifidobacterium*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2. Auflage. (Editors: Sneath, H. A. P., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G.). MD: Williams & Wilkins, Baltimore. S 1418–1435.
- Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M-C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R. D. und Arigoni, F. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** (22), S. 14422–14427.
- Touré, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O. und Fliss, I. (2003). Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* **95** (5), S. 1058-1069.
- Ventura, M., Lee, J.-H., Canchaya, C., Zink, R., Leahy, S., Moreno-Munoz, J A., O'Connell-Motherway, M., Higgins, D., Fitzgerald, G. F., O'Sullivan, D. J. und van Sinderen, D. (2005). Prophage-Like Elements in *Bifidobacteria*: Insights from Genomics, Transcription, Integration, Distribution and Phylogenetic Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (12), S. 8692-8705.
- Ventura, M., Canchaya, C., Pridmore, D. und Brussow, H. (2004). The prophages of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533: comparative genomics and transcription analysis. *Virology* **320** (2), S. 229–242.
- Ventura, M., Canchaya, C., Kleerebezem, M., de Vos, W. M., Siezen, R. J. und Brussow, H. (2004). The prophage sequences of *Lactobacillus plantarum* strain WCFS1. *Virology*. **316** (2), S. 245–255.
- Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K. H., Dennis, J. J. und Wishart, D. S. (2011). PHAST: A Fast Phage Search Tool. *Nucleic Acids Research* **39** (2), S. 347-352.

## Anhang

Tabelle 14: Geräteliste mit Hersteller und Typ/Bezeichnungsangabe.

Gerät	Typ/Bezeichnung	Hersteller
Bioreaktor DCU	Biostat B 2 I Type 8840326	B. Braun Biotech (Sartorius AG)
Brutschrank	B12	Heraeus Sepatech
Eismaschine	AF 100 AS	Scotsman® Frimont S.p.A. Pogliano MIL (MI)
Geldokumentationskammer	Imager Chemi Premium	Peqlab GmbH, VWR
Gelelektrophorese-Kammer	Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH
Herdplatte	Ceran	Schott
Kolbenhubpipette	Reference Research Plus (1000 µl, 100 µl, 10 µl)	Eppendorf AG
Koloniezählgerät	BZG 30	Wissenschaftlich-technische Werkstätten
Kühltruhe (- 20 °C)	Comfort Plus	Siemens AG
Kühlzentrifuge Rotor	J2-21 JA-10	Beckman Coulter GmbH
Magnetrührer	MR3002C	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Mini-Brutschrank	Incu Line Cool	Peqlab GmbH, VWR
Peristaltikpumpe	505U AutoDrive	Watson-Marlow Ltd.
pH-Meter	MP22D Delta 340	Mettler Toledo GmbH
Phasenkontrastmikroskop Objektiv Kamera	Axioskop 2 Plan-APOCHROMAT 63x/1,40 Oil Axiocam ICc 1	Carl Zeiss AG
Photometer	Nanocolor® 250 D Spectronic 20D+	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG Milton Roy (Thermo Fisher Scientific Inc.)
Pipettierhilfe	accu-jet pro	Brand GmbH & CO KG
Power-Supply	Mini Power Pack P20	Biometra GmbH
Reinstwasseranlage	arium® pro	Sartorius AG
Schüttler	Rocky	Edmund Bühler GmbH

Gerät	Typ/Bezeichnung	Hersteller
Sequenzierer	MiSeq	Illumina Inc.
Sicherheitswerkbank	Claire Claire pure	Berner International GmbH
Spektralphotometer	NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific Inc.
Sterilwerkbank	LaminAir S2000 1.8	Heto Holten A/S
Thermoblock	CHB-202	BIOER
Thermocycler	peqSTAR 2X	Peqlab Biotechnology (VWR)
Vortex Mixer	Vortex Genie® 2	Scientific Industries Inc
Waage	ENTRIS6202I-1S	Sartorius AG,
Wasserbad	MC	Julabo
	GFL 1083	Eydam
Zentrifuge	Fresco 21	Thermo Fisher Scientific
	Heraeus Pico 17	
Ultrazentrifuge	Optima L-90K	Beckman Coulter GmbH

Tabelle 15: Eingesetzte Software und deren Entwickler.

Software	Unternehmen/Quelle
Axio Vision Rel. 4.8.2.0	Carl Zeiss AG
BLASTn	NCBI
Geneious Version 9.1.2 (Assembly der Contigs)	Biomatters Ltd.
Multi-Fermenter-Kontroll-System 3.0	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Nanodrop 2000c 1.4.2	Thermo Fisher Scientific Inc.
RAST (Annotation der Gene), Freeware	<a href="http://rast.nmpdr.org/">http://rast.nmpdr.org/</a>
SnapGene Version 2.6.2 (Erstellen von Genomkarten, Design von Primern)	GSL Biotech LLC
VWR Image Capture Software 1.5.6.0	VWR International Ltd.

Tabelle 16: Verwendete Materialien und deren Hersteller.

Material	Modell/Typ	Hersteller
Anaerobierbeutel	Oxoid AnaeroGen®, 2,5l-Beutel	Thermo Fisher Scientific Inc.
Anaerobiertopf	AnaeroCult® 2,5 l	Thermo Fisher Scientific Inc.
Deckelflasche	25 ml – 1 l	Schott AG
Falkon-Röhrchen	Cellstar® Tubes, 50 ml	Greiner Bio One
Hungate-System	Schraubröhrchen + Kappe Butylseptum	Glasgerätebau Ochs Laborfachhandel e. K.
Kryo-Tubes	2 ml	VWR International Ltd.

Material	Modell/Typ	Hersteller
Kanüle	20cm, Ø <sub>i</sub> 2mm	
Messbecher	25 ml – 500 ml	Schott AG
Messzylinder	10 ml – 1 l	Schott AG
Mikrotiterplatte	96 Well	Eppendorf AG
Nitril-Handschuhe	rotiprotect®	Carl Roth GmbH & Co. KG
Objektträger		Menzel GmbH
Petrischale		Greiner Bio One
PCR-Tubes	200 µl, mit Deckel	Eppendorf AG
Pipettenspitzen	Filtertips u. ohne Filter	Eppendorf AG
Plattierungsspatel		Sarstedt AG
Reagenzgläser + Kappe	15 ml	
Serologische Pipette	10ml, 5ml	Sarstedt AG
Spritze	Injekt® (2 ml, 20 ml)	B Braun Melsungen AG
Sterilfilter	Filtropur S®, 0,45 µm	Sarstedt AG
	Whatman®, 0,2 µm	GE Healthcare AG
Tubes	Safe-Lock® Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG
Zentrifugenbecher	Nalgene®, 500 ml	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 17: Chemikalienliste mit Herstellerangaben.

Chemikalie	Hersteller
Agar-Agar	Merck KGaA
Agarose	AppliChem GmbH
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA
Di-Ammoniumhydrogencitrat	Merck KGaA
DNA Leiter 1 kb und 100 bp plus	New England BioLabs Inc
DNase	Thermo Fisher Scientific Inc.
DreamTaq Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc.
Eisenchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA
Essigsäure	Carl Roth GmbH
Ethanol (vergällt/unvergällt)	Merck KGaA
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure	AppliChem GmbH
Fleischextrakt	BD Becton Dickinson

Chemikalie	Hersteller
(D+)-Glukose-Monohydrat	Merck KGaA
Glycerol (85 %)	Merck KGaA
Hefeextrakt	BD Becton Dickinson
Isopropanol (2-Propanol)	Merck KGaA
L-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat	Merck KGaA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KGaA
Mangansulfat-Monohydrat	Merck KGaA
Mitomycin C	Sigma Aldrich Inc.
Natriumacetat	Merck KGaA
Natriumchlorid	AppliChem GmbH
Natriumhydroxid	Merck KGaA
PEG 6000	SERVA Electrophoresis GmbH
Pepton	BD Becton Dickinson
Polysorbat 80f	Carl Roth GmbH
Ringertabletten	AppliChem GmbH
RNase	Thermo Fisher Scientific Inc.
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid	AppliChem GmbH
Trypton	BD Becton Dickinson
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck KGaA

Tabelle 18: Eingesetzte Puffer und Lösungen mit Zusammensetzung.

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Menge
Ringerlösung (1/4 stark)	Ringertabletten	2 Stk.
	rH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
CaCl <sub>2</sub> -Lösung (40 mM)	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,59 g
	rH <sub>2</sub> O	ad 100 ml
50x TAE-Puffer	Tris-HCl	242 g
	Essigsäure	57,1 ml
	EDTA	18,6 g
	rH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
SM Puffer	NaCl	5,8 g
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2 g
	1 M Tris-HCl (pH 7,5)	50 ml
	rH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

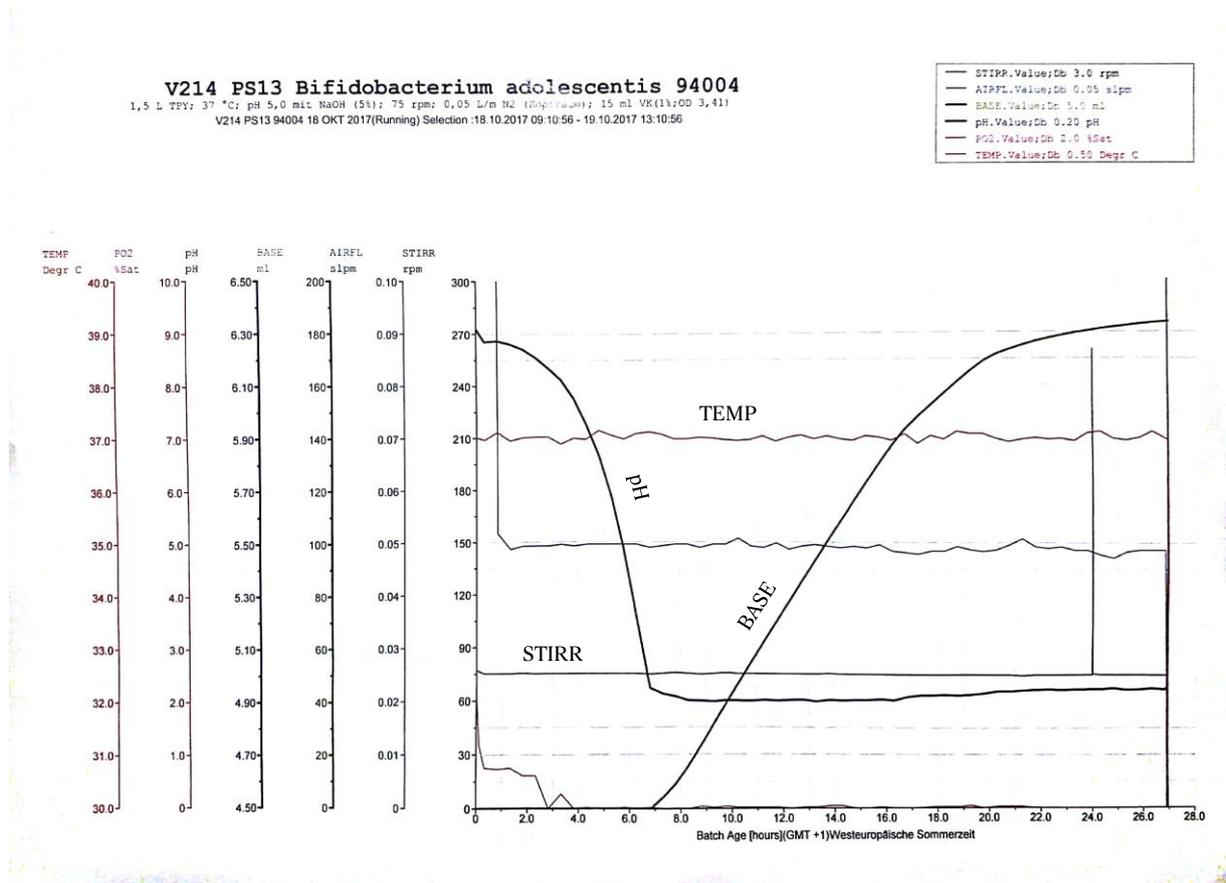


Abbildung 14: Aufgezeichnete Parameter der Kultivierung von *B. thermophilum* 94004 durch MFCS 3.0.

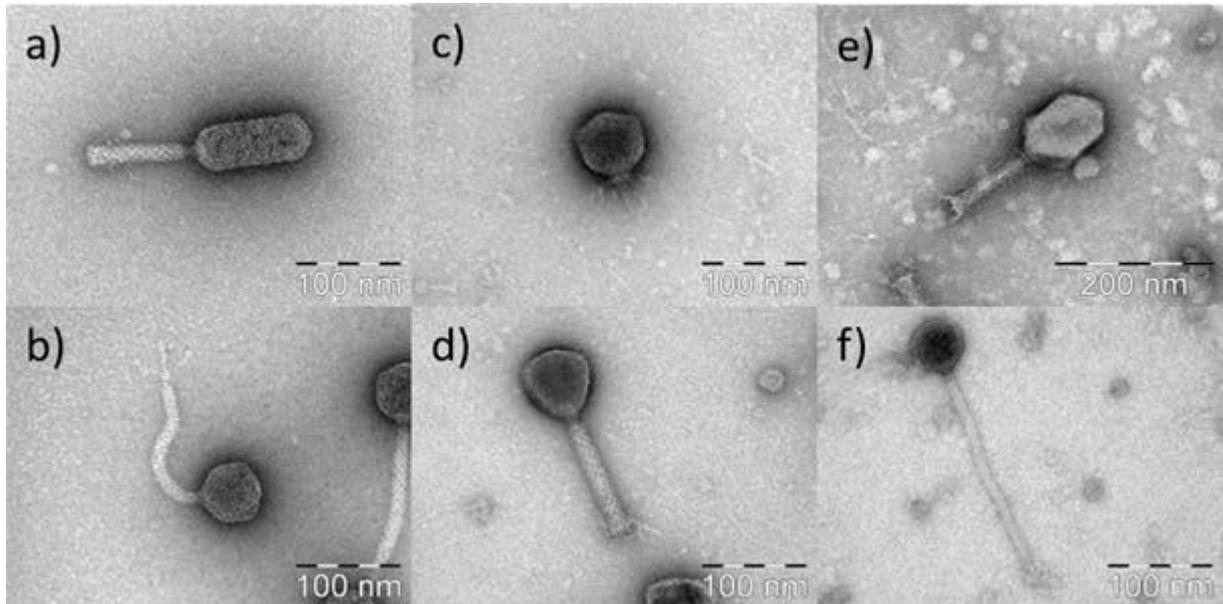


Abbildung 15: TEM-Aufnahmen von Bakteriophagen verschiedener Gruppen. Myoviridae (a, d, e), Siphoviridae (b, f) und Podoviridae (c).

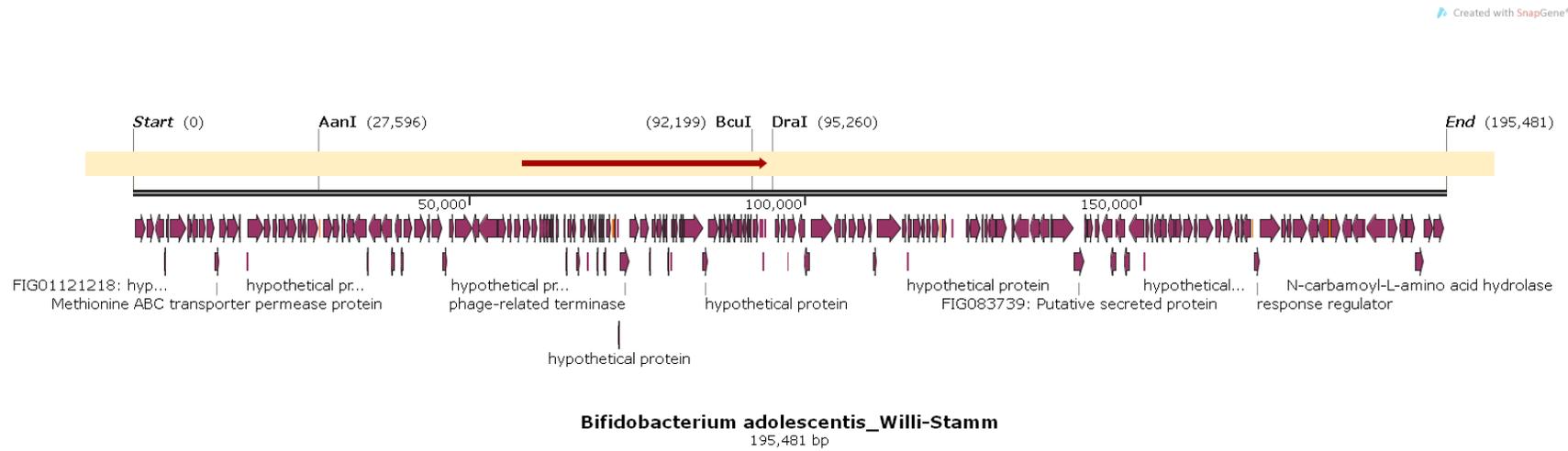


Abbildung 16: Assemblede Genomdarstellung des *B. thermophilum* mit annotierten Genen. Der rote Pfeil stellt den Phagen „Willi“ im Genom dar.

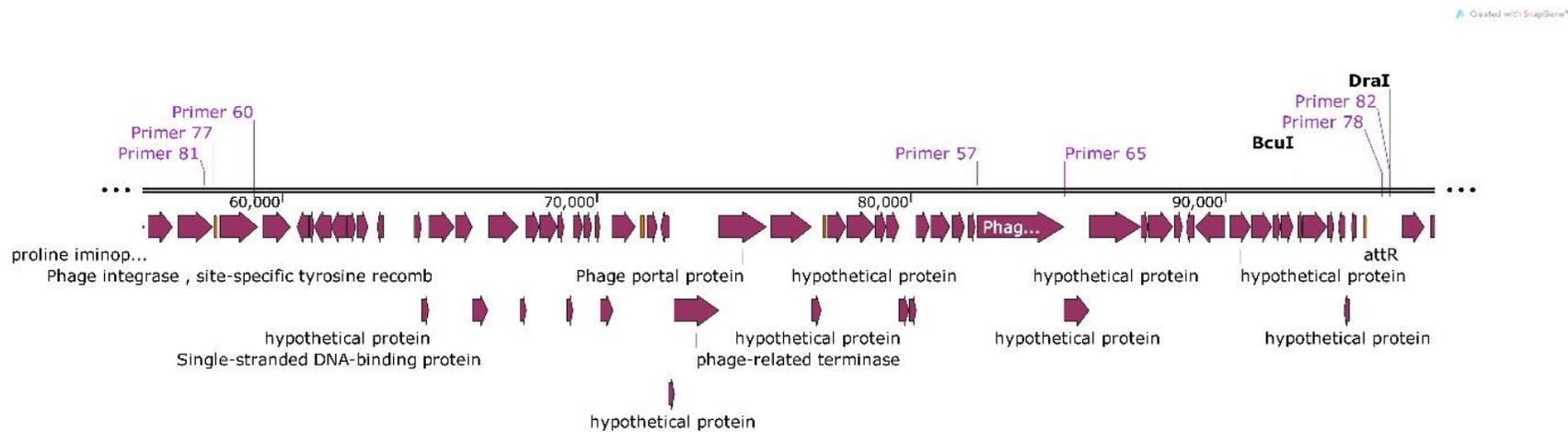


Abbildung 17: Assemblede Genomdarstellung des Phagen „Willi“ mit annotierten Genen.

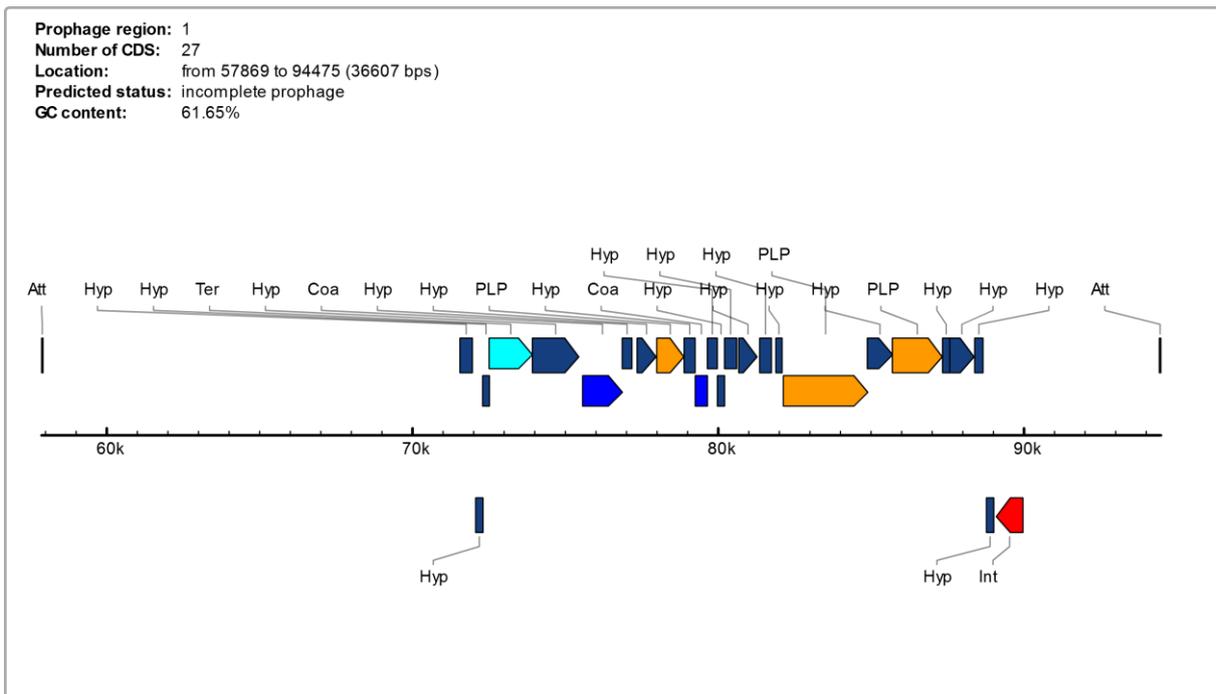
Tabelle 19: Endwerte für OD und LKZ bei vor dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen von *B. thermophilum* 94004 unter gleichen Bedingungen wie in Kapitel 3.4.1 genannt.

Datum der Kultivierung	End-OD	END-LKZ in KBE ml <sup>-1</sup>
13.07.2016	-	6,7·10 <sup>8</sup>
20.07.2016	5,6	2,1·10 <sup>9</sup>
16.08.2016	5,5	9,7·10 <sup>8</sup>
07.09.2016	-	9,0·10 <sup>8</sup>
13.09.2016	9,0	2,1·10 <sup>10</sup>
20.09.2016	-	9,0·10 <sup>9</sup>
27.09.2016	8,7	2,0·10 <sup>10</sup>
04.10.2016	6,9	7,5·10 <sup>9</sup>
11.10.2016	6,4	4,6·10 <sup>9</sup>
18.10.2016	4,3	5,0·10 <sup>9</sup>
01.11.2016	3,6	6,7·10 <sup>8</sup>

Tabelle 20: Detaillierte Anleitung der DNA-Extraktion mit dem „peqGOLD Bacterial DNA Mini Kit“.

Schritt	Anweisung	Material
1.	Zentrifugation der Kultur (1 ml) bei 4000 x g für 10 min	Tischzentrifuge
2.	Pellet resuspendieren	100 µl TE Buffer 100 µl Lysozym
3.	10 min bei 30 °C und 650 rpm inkubieren	Thermoschüttler
4.	Zentrifugation bei 4000 x g für 5 min	Tischzentrifuge
5.	Pellet resuspendieren, vortexen	400 µl DNA Lysis Buffer T 20 µl Proteinase K (20 mg ml <sup>-1</sup> ) 15 µl RNase (20 mg ml <sup>-1</sup> )
6.	30 min bei 50 °C und 650 rpm inkubieren	Thermoschüttler
7.	Zugabe des Puffers, sorgfältig mischen und alles auf eine Säule, die in einem Tube steckt, geben	PerfectBind DNA Säule 2 ml Collection-Tube
8.	Zentrifugation bei 10000 x g für 1 min, Durchfluss werfen	Tischzentrifuge
9.	Säule in frisches Tube stecken, Pufferzugabe	650 µl DNA Wash Buffer

10.	Zentrifugation bei 10000 x g für 1 min, Durchfluss verwerfen	Tischzentrifuge
11.	Wiederholung Schritte 9 & 10	s. o.
12.	Zentrifugation bei 10000 x g für 2 min	Tischzentrifuge
13.	Säule in steriles Eppendorfgefäß geben, Zugabe des Puffers (direkt auf Matrix), 3 min inkubieren	50-100 µl Elution Buffer
14.	Zentrifugation bei 6000 x g für 1 min	Tischzentrifuge



**Identified CDS types:**

	1	Lysis		2	Terminase		3	Portal
	4	Protease		5	Coat		6	Tail shaft
	7	Attachment site		8	Integrase		9	Other phage-like protein
	10	Hypothetical protein		11	Other		12	Transposase
	13	Tail fiber		14	Plate		15	tRNA

Abbildung 18: Graphische Darstellung des Contig 14 inkl. mittels PHAST ermittelten Genen aus dem Genom des *B. thermophilum* 94004 Stammes.

# Eidesstattliche Erklärung

Name, Vorname: \_\_\_\_\_

Matrikel-Nr.: \_\_\_\_\_

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe.

Wortwörtlich oder sinngemäß übernommene Textstellen aus der Literatur sind in allen Fällen unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde in der vorgelegten oder einer ähnlichen Fassung keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, wurde nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Ort, Datum: \_\_\_\_\_

Unterschrift: \_\_\_\_\_