



Hochschule Neubrandenburg  
University of Applied Sciences

**Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften**

**Studiengang Lebensmitteltechnologie**

**Kann die mikrobiologische Sicherheit von Lebensmitteln  
(am Beispiel von Geflügel) mit Hilfe von Bakteriophagen  
verbessert werden?**

**Bachelor-Thesis**

Verfasser: Asel Kushmanova

Betreuer: Prof. Dr. Eckhardt Schulz

Prof. Dr. Karl Steffens

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis 2012-0012-2

Neubrandenburg, 16. Februar 2012

# Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	3
1 Einleitung .....	4
2 Stand des Wissens.....	7
2.1 Biologie der Bakteriophagen .....	7
2.2 <i>Escherichia coli</i> als Wirtsbakterium des Bakteriophagen T4.....	12
2.3 Mikrobielle Kontamination und Verderb der Lebensmitteln am Beispiel des Geflügels.....	14
2.4 Verwendung von Bakteriophagen zur Kontrolle pathogener Bakterien und Verderbniserreger in Lebensmitteln.....	18
3 Materialien und Methoden .....	22
3.1 Geräte und Materialien .....	22
3.2 Züchtung der T4-Phagen in Flüssigkultur mit anschließender Aufbewahrung des Phagenlysats.....	23
3.3 Behandlung von Hähnchenbrustfilets mit <i>Escherichia coli</i> K12.....	25
4 Auswertung der Ergebnisse und Diskussion.....	26
4.1 Züchtung der T4-Phagen in Flüssigkultur mit anschließender Aufbewahrung des Phagenlysats.....	26
4.2 Behandlung des Hähnchenbrustfilets mit der <i>Escherichia coli</i> K12.....	34
4.3 Ausblicke der weiteren Experimente .....	36
5 Zusammenfassung .....	40
6 Literaturverzeichnis .....	42
7 Abbildungsverzeichnis.....	46
8 Tabellenverzeichnis .....	47
9 Anlage .....	48

## **Abstract**

Processed foodstuff allow people to consume it at all places and at any time; as a result, people's concern regarding safety of foods and hygiene measures in food production has also increased considerably over the last decades. Food-borne infectious cases are presently among the most essential problems of food production in the world. However, existing approaches and techniques are still not effective enough in controlling this issue. Up-to-date methods and technologies which could ensure the safety of food and propose more effective control approaches are under research currently. At the same time, the danger associated with food contamination due to dramatically increased production volumes could potentially cause mass epidemics.

Phages being a natural predator of unwanted bacteria are considered as an ideal tool in providing food safety during the production process. Bacteriophages are viruses that attack and lyse bacteria. They are proposed as alternatives to antibiotics for many antibiotic resistant bacterial strains. Modern scientific findings show the effective usage of phages as biocontrol agents against various pathogens without interfering with the natural microflora or the cultures in fermented products. In the future, it is likely that new phage products will be targeted against emerging food-borne pathogens.

Poultry products have perhaps been the most widely-used meats to study the efficacy of bacteriophage-mediated biocontrol in foods. This explains the choice of chicken meat as a research subject in this bachelor thesis. Bacteriophages have been used to investigate their impact on pathogen bacteria reduction in chicken products.

# 1 Einleitung

Bakteriophagen sind Viren, die in der Lage sind die Bakterienzellen zu töten. Die sind älteste Mikroorganismen auf der Erde (nach einiger Einschätzungen – ca. 3 Millionen Jahre alt) und die größte Gruppe der bekannten der Viren. Moderne Klassifikation fasst 13 Familien um, die mehr als auf 140 Gattungen geteilt sind, welche wiederum mehr als 5300 Arten enthalten. Bakteriophagen haben spezifische, so genannte „Phagen-Wirtszelle“, Verhältnisse mit den Bakterien, darüber hinaus sie spielen eine Schlüsselrolle in der Gewährleistung von mikrobiologischen Bilanz in beliebigem Ökosystem, wo die Bakterien anwesend sind. Felix d’Herelle, der als Begründer der angewandte Wissenschaft über Bakteriophagen gilt, war der erster, der die Anwendung der Phagen zwecks der Biokontrolle vorausgesehen hat. Mit jedem Jahr die zunehmende Anzahl der Publikationen über den Untersuchungen von Bakteriophagen stellen deren Potenzial in dem Bereich der Kontrolle von pathogenen Bakterien in Lebensmitteln dar. Trotz der positiven Ergebnisse der Untersuchungen bleiben noch einige Aspekte, die die breitere und reguläre Benutzung von Phagen verhindern (Goodridge et al., 2011).

In diesem Zusammenhang haben Hagens und Loessner (2010) die Reihe der Eigenschaften von Phagen zusammengefasst, die für die Biokontrolle der Qualität von Lebensmitteln erwünscht sind:

- Fähigkeit zur Infizierung mehrerer Zielstämme
- Die Phagen sollen strikt lytisch (virulent) sein
- Die Phagen sollen in der Lage sein, sich in Nicht-Wirtsbakterien zu vermehren
- Die komplette Genomsequenz soll bekannt sein
- Die Anwendung der Phagen soll keine nachteiligen Effekte aufweisen
- Die auf den Phagen basierenden Lebensmittel sollen den Anforderungen von American Food and Drug Administration entsprechen
- Stabilität bei der Aufbewahrung
- Die Phagen sollen für die Anwendung im industriellen Bereich geeignet sein

Heutzutage weisen verschiedene Literaturquellen großes Interesse zu der Anwendung von Phagen für die Reduzierung der pathogenen Keime in Lebensmitteln auf.

In den letzten Jahren, die durch überflüssige Benutzung von Antibiotika und stabile Entwicklung der antibiotikaresistenten Bakterien gekennzeichnet sind, ist eine Notwendigkeit in den alternativen Bekämpfungsstrategien gegen Infektionskrankheiten entstanden.

Da die Phagen überall anwesend sind, können die mit der Lebensmitteln oder Wasser eingenommen werden, aber bis heute hat man keine nachteiligen Auswirkungen von denen festgestellt. Bakteriophagen sind oft auf der Oberfläche von rotem und weißem Fleisch, Fisch und anderer Lebensmitteln zu finden. Außerdem sind viele fermentierte Lebensmittel durch Phagen, entweder von der Umgebung oder von den Wirtsbakterien selbst (bei lysogenen Bakteriophagen), kontaminiert.

Im Laufe von mehreren Jahren wurden die Bakteriophagen in den Lebensmitteln aus verschiedenen Gründen erforscht und unter anderem:

- Die Bakteriophagen haben einen Einfluss auf die Verderbnisbakterien und können für deren Beseitigung verwendet werden.
- Die Bakteriophagen können auch als Indikatoren bei der Kontamination durch Darm- und Fäkal-Bakterien angesehen werden.
- Die Bakteriophagen weisen oft schädliche Auswirkungen auf bestimmten fermentierten Lebensmitteln auf (Andreoletti et al., 2009).

Magen-Darm-Erkrankungen des Menschen durch *Campylobacter*-Bakterien sind neben den Salmonellosen am häufigsten aufgetretene Krankheit in Deutschland. Im Jahr 2005 wurden 64 590 humane *Campylobacter*-Infektionen angemeldet. Die Hauptrolle bei der Übertragung von Infektion spielen tierische Lebensmittel, vor allem das Geflügelfleisch. In viele Studien wurde festgestellt, dass der Verzehr von Geflügelfleisch und dessen Behandlung für die Zubereitung von Gerichten ein Risiko der humanen *Campylobacter*-Infektionen aufweist. Etwa 47 % der in Deutschland aufgetretenen *Campylobacter*osefälle können auf das Hähnchenfleisch zurückgeführt werden und fast 60 % von *Campylobacter* spp. werden im Einzelhandel nachgewiesen (BfR, 2006).

In diesem Zusammenhang werden die Geflügelerzeugnisse wohl am häufigsten für die Untersuchung der Effektivität von Biokontrolle in Lebensmitteln durch Bakteriophagen verwendet. Die bakterielle Kontamination der Geflügelerzeugnisse ist grundlegendes und schwierig lösbares Problem, wobei nicht nur der Lebensmittelsicherheit, aber auch der Wirtschaft, da die Verderbnisbakterien einen bedeutenden wirtschaftlichen Schaden hervorrufen können.

Die Bakteriophagen werden häufig auf die Bekämpfung gegen die auf der Geflügelhaut anwesenden Vertreter der *Campylobacter* und *Salmonella* gezielt. Die Kontamination durch die *Campylobacter*-Keimen geschieht meistens aufgrund derer Verbreitung im Geflügelkot. Darüber hinaus ist dieser Bakterienart gut zur Geflügeldarmmilieu angepasst. Diese Faktoren verursachen schnelle Vermehrung nicht nur im inneren der Broiler, aber auch auf der Oberfläche des Geflügels. Aber anhand vieler Studien kann man feststellen, dass die Anwendung

der Bakteriophagen für die Reduzierung dieser Bakterienarten meistens gut gelungen ist (Bielke et al., 2007, Goode et al., 2003, Atterbury et al., 2003).

Großes Interesse zu den Phagen als Mitteln der Biokontrolle ist wahrscheinlich mit der in den letzten Jahren erhöhten Nachfrage für die Naturprodukte, sowie mit den fortgesetzten Lebensmittelinfektionen verbunden.

In der vorliegenden Arbeit sind die Vermehrungseigenschaften der Bakteriophagen, deren Anwendung bei der Reduzierung pathogener Keime in Lebensmitteln, sowie die Möglichkeit der Züchtung und Aufbewahrung von Bakteriophagen am Beispiel von T4-Phagen dargestellt. Als die Ausblicke der weiteren Experimente sind Optimierungsmöglichkeiten der Haltbarmachung von Phagen und die Anwendung der Bakteriophagen T4 zur Behandlung des künstlich kontaminierten Geflügelfilets beschrieben.

## 2 Stand des Wissens

### 2.1 Biologie der Bakteriophagen

Bakteriophagen (vom griechischen „Bakterienfresser“) können als intrazelluläre Bakterienparasiten definiert werden, die an einen unabhängigen Metabolismus mangeln. Das Jahrhundert von Untersuchung der Phagen hat entdeckt, dass diese Viren, die als Wirtszellen die Bakterien und Archaeen auswählen, äußerst vielfältig und allgegenwärtig in der Biosphäre dargestellt sind (Sabour et al., 2010).

Ihre extrazelluläre Form (der Virion) verhält sich als ein inerter Teil, der aus einer Nukleinsäure (meistens eine doppelsträngige DNA), umgebend durch einen Proteinmantel (der Capsid) zusammengesetzt ist. Die meisten Bakteriophagen, die eine doppelsträngige DNA besitzen, weisen einen Einspritzapparat auf, um einen Durchgang der Neukleinsäure durch Bakterienzellwand und Plasmamembran zu gewährleisten. Insgesamt haben Phagen einen Größenbereich zwischen 25 und 200 nm. Bakteriophagen trifft man häufig im Salzwasser, Frischwasser, Erdboden, Pflanzen und Tieren. Ebenso sind sie als unabsichtliche Kontaminationsstoffe von Milch und mancher gewerblich verfügbaren Impfstoffen bezeichnet. Sie kommen auch im menschlichen Darm- und Urogenitaltrakt und sogar auf der Haut vor.

Darüber hinaus schon bald nach ihrer Entdeckung vor dem Ansatz der Antibiotika wurden sie als therapeutische Mittel in Westländern für die Behandlung von inneren und oberflächlichen Infektionen benutzt. Beim ihrem Gebrauch wurden keine nachteiligen Effekte aufgezeichnet (Andreoletti et al, 2009).

Zum ersten Mal wurden die Bakteriophagen von Frederick Twort im 1915 und von Félix Hubert d’Herelle im 1917 beschrieben. Nach Erfindung der Phagen bemühte man sich die zu klassifizieren. Heute wird die Taxonomie von Bradley (1965) benutzt.

Anhand des Erbmaterials (einzeln- oder doppelsträngige RNA bzw. DNA) und der Morphologie der Phagen unterteilt man sie in sechs Hauptgruppen (Morphotypen A-F). Das System von Bradley hat man erweitert, als die neu entdeckten Phagen genauer differenziert und eingliedert waren. Heutzutage werden die Bakteriophagen in 14 Familien gegliedert. Mehr als 95 % aller Phagen sind in der Literatur beschrieben und fast alle wichtige Phagen, verbunden mit in Lebensmitteln vorkommenden Pathogenen, gehören zu der Gruppe *Caudovirales* oder geschwänzte Phagen mit dsDNA (doppelsträngige DNA). *Caudovirales* setzen sich zusam-

men aus drei Hauptfamilien, die sich in ihrer verschiedenen Schwanzmorphologie unterscheiden: *Myoviridae* mit langem, kontraktilem Schwanz, *Podoviridae* mit kurzem, nicht-kontraktilem Schwanz und *Siphoviridae* mit langem, nicht-kontraktilem Schwanz. *Siphoviridae* machen mit 61 % den größten Anteil der geschwänzten Phagen aus, wobei *Myoviridae* und *Podoviridae* – jeweils 25 % und 15 %. Es kommen auch schwanzlose und filamentöse Phagen vor, manche von welchen sehr klein sind. Die stellen nur 3 bis 4 % untersuchter Phagen dar und gehören zu restlichen 11 Familien (Kaps, 2010). Die Abbildung 1 stellt die Morphologietypen der Bakteriophagen dar.

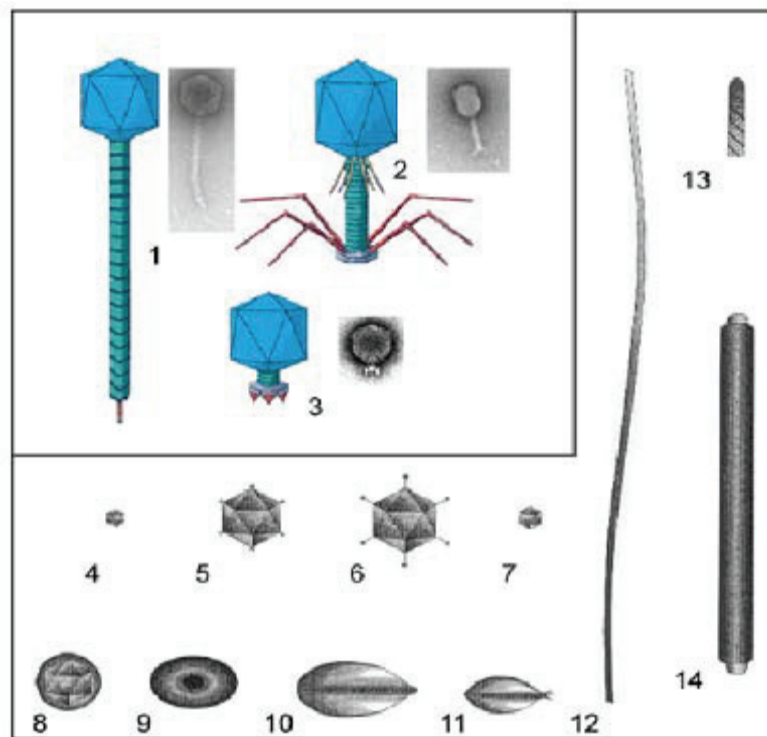


Abbildung 1: Darstellung der Morphologietypen von Bakteriophagen (Kaps, 2010)

1: *Siphoviridae*, 2: *Myoviridae*, 3: *Podoviridae*, 4: *Microviridae*, 5: *Corticiviridae*, 6: *Tectiviridae*, 7: *Leviviridae*, 8: *Cystoviridae*, 9: *Plasmaviridae*, 10: *SNDV-like*, 11: *Fuselloviridae*, 12: *Inoviridae* (*Inovirus*), 13: *Inoviridae* (*Plectovirus*), 14: *Lipothrixviridae*.

Die Studie der chemischen Zusammensetzung von Phagen ist nur dann möglich geworden, als die Verfahren der massenhaften Herstellung von gereinigten Phagenpräparaten vervollkommen waren. Heutzutage ist der chemische Aufbau der Phagen untersucht, die zur verschiedenen morphologischen Typen gehören und die Mikroorganismen fast aller systematischen Gruppen befallen. Die Hauptkomponenten von Phagen sind Proteine und Nukleinsäuren. Es ist wichtig,



zu bemerken, dass Phagen, wie auch andere Viren, nur einen Typ der Nukleinsäure – Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA) besitzen. Durch diese Eigenschaft unterscheiden sich die Viren und Phagen von den Mikroorganismen, die in der Zelle beiden Typen der Nukleinsäuren enthalten.

Nukleinsäure befindet sich im Kopf des Phagen. Innerhalb des Kopfes wurde auch eine kleine Menge des Proteins (ca. 3 %) nachgewiesen. Somit gemäß der chemischen Zusammensetzung sind die Phagen Nukleoproteiden. Je nach dem Typ ihrer Nukleinsäure unterteilt man sie in DNA- und RNA-Phagen. Die Menge vom Protein und Nukleinsäure bei verschiedenen Phagen ist unterschiedlich. Bei einigen Phagen ist der Gehalt von denen fast gleich und jede dieser Komponenten macht ungefähr 50 % aus. Bei anderen Phagen kann das Verhältnis zwischen diesen Hauptkomponenten unterschiedlich sein (Krasilnikov et al, 1974).

Aufbau eines T-Bakteriophagen ist in der Abbildung 2 veranschaulicht. Das genetische Material DNA ist im Phagenkopf von Proteinen umhüllt. Zu dem Kopf ist noch ein Schwanz aus Proteinen angeschlossen, der in der Schwanzfaser übergeht (Regenass-Klotz, 2005).

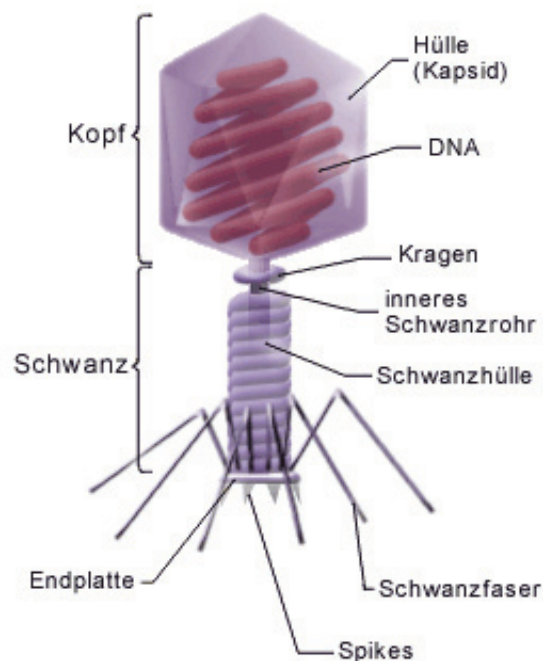


Abbildung 2: Aufbau des T-Phagen (Hensel, 2012)

Die Wechselbeziehungen zwischen dem Phage und der gegen ihm empfindlichen Zelle sind sehr kompliziert und nicht immer durch die Zelllyse und anschließenden Vermehrung von Phagen enden. Unten wird solche Infektion der Zelle betrachtet, die durch unmittelbaren Zell-

tot gekennzeichnet sind. Solche Infektion nennt man auch produktiv. In der Abbildung 3 ist die Vermehrung von Phagen in zwei Zyklen dargestellt.

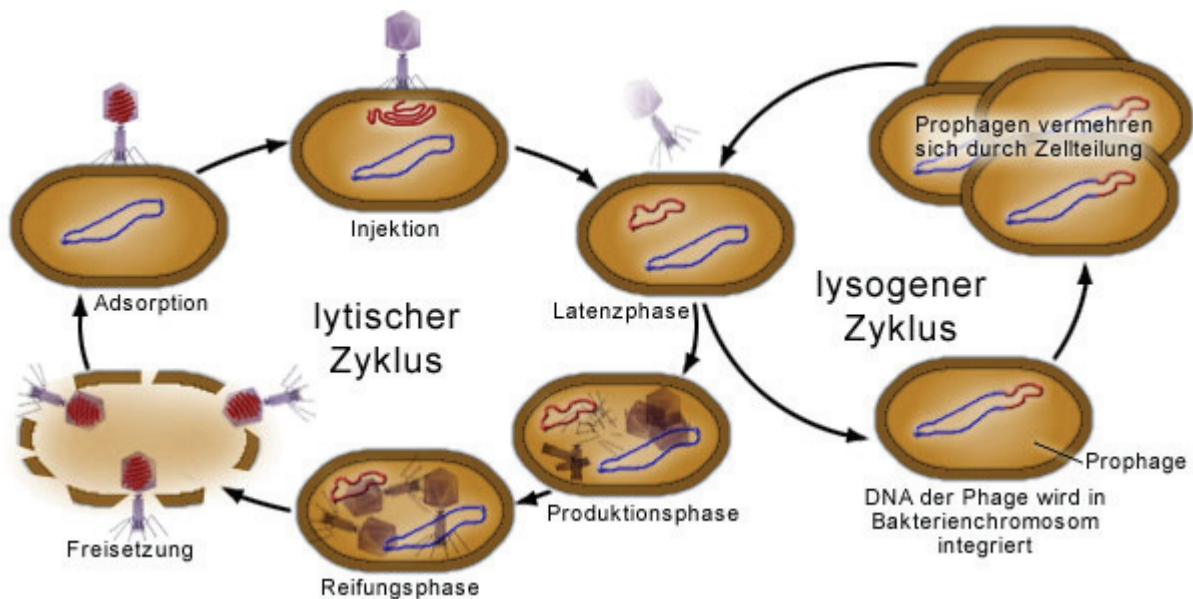


Abbildung 3: Vermehrung von Phagen nach lytischem und lysogenem Zyklus (Hensel, 2012)

Die wichtigste Besonderheit der Phagenvermehrung ist, dass sie nur in den lebenden Zellen geschehen kann, die sich in der Wachstumsphase befinden.

In den toten Zellen, sowie den Produkten des Zellstoffwechsels verläuft die Vermehrung der Phagen nicht. Der Prozess der Phagenvermehrung ist kompliziert und besteht aus den folgend konsequent verlaufenden Schritten: Adsorption der Phagen an die Oberfläche von Bakterienzelle; Injektion des Inhaltes von Phagenkopf (Nukleinsäure) in die Bakterienzelle; intrazelluläre Entwicklung des Phagen, die in die Bildung neuer Phagen mündet; Lysis der Bakterienzelle und die Freisetzung der neuen Phagen von ihr aus.

Die Zeit ab dem Moment der Zellinfizierung durch den Phagen bis zur Lysis der Zelle heißt latente oder verborgene Phase. Dauer dieser Periode ist für verschiedenen Phagentypen unterschiedlich und hängt von der Temperatur, der Zusammensetzung des Stoffes und anderer Faktoren ab. Die Latenzphase der Phagen, die für gewissen Bakterien spezifisch sind, kann 15-40 Minuten betragen, für anderen – 5 Stunden oder mehr. Bei niedriger Temperatur nimmt die Latenzphase wesentlich zu.

Von allen Phasen der Phagenvermehrung ist die erste am meisten untersucht – die Adsorption. Die Adsorption der Phagen ist sehr spezifische Reaktion. In der Bakterienzellwand sind besondere Rezeptoren vorhanden, an denen Phagen sich befestigen können. Auf den Rezeptoren werden nur jene Phagen adsorbiert, gegen die die Zelle empfindlich ist.

Phagen, die einen Schwanz besitzen, befestigen sich durch das freie Schwanzende zur Bakterienzelle. Fadenförmige Phagen, sowie die Phagen, die keinen Schwanz aufweisen, adsorbieren nicht an der Bakterienzellwand, sondern an den fadenförmigen Anhängen – Fimbrien. Es sind auch solche Phagen beschrieben, die zu den Geißeln des Bakteriums befestigt werden. Bei manchen Phagen kann die Adsorption nur dann erfolgen, wenn im Medium bestimmte Stoffe vorhanden sind – Cofaktoren: Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin) oder Salzen (Calcium-, Magnesiumsalze).

Am Ende des Phagenschwanzes liegt ein besonderes Enzym ähnlich dem Lysozym vor. Nach der Adsorption unter dem Einfluss dieses Ferments geschieht die Auflösung der Zellwand und der Inhalt des Phagenkopfes – Nukleinsäure – geht in die Bakterienzelle über. Hiermit ist die zweite Phase des Prozesses der Phagenvermehrung zu Ende.

Die restlichen Teile des Phagen – Kopfhülle, Schwanz und seine Substrukturen – gehen in die vom Phagen infizierte Zelle nicht. Ihre Rolle besteht in der Gewährleistung der Phagensicherheit und der Mitwirkung bei der Injektion der Nukleinsäure in die Zelle.

Nach dem Eindringen der Nukleinsäure des Phagen in die Zelle fängt ein komplizierter Vorgang der intrazellulären Vermehrung der Phagen an. Unter dem Einfluss der Nukleinsäure des Phagen ändert sich sprunghaft der ganze Stoffwechsel der Zelle. Die Hauptprozesse, die in infizierter Zelle verlaufen, sind auf die Entstehung neuer Phagen gerichtet. Zunächst bilden sich separat die Köpfe und Schwänze aus, die anschließend in die reifen Phagen zusammengeschlossen werden. Zu dieser Zeit innerhalb der Zelle entsteht ein besonderes lytisches Enzym, das die Lysis der Zelle von innen hervorruft. Die Zelle zerfällt, und die neuen reifen Phagen gehen heraus.

Die Anzahl neuer Phagen, die mittels einer einzigen Zelle entstanden sind, nennt man die Ausbeute der Phagen. Die Anzahl neu gebildeter Phagen hängt von den Eigenschaften des gegebenen Phagen ab, und nicht von der Wirtszelle und ihrer Größe. Einige Phagen unterscheiden sich durch sehr geringe Ausbeute (5-50 Phagen pro Zelle), bei anderen ist diese Zahl (von 1000 bis 2500) wesentlich höher. Durch die besonders hohe Ausbeute unterscheiden sich kleine RNA-Phagen (über 20 000 Phagen pro Zelle). Wenn eine große Menge von Bakterienzellen mit einer kleinen Anzahl an Phagen zusammen gemischt wird, so geht der Prozess der Phagenvermehrung mehrere Zyklen durch. Zunächst wird nur ein Teil der Zellen infiziert. Die ersten Nachkommen des Phagen infizieren die gebliebenen Zellen – es geschieht der zweite Zyklus, ihm kann dritter folgen usw., bis alle gegen dem gegebenen Phage empfindlichen Zellen infiziert werden (Krasilnikov et al, 1974).

Ein Phagenbefall endet für die Wirtszelle nicht immer tödlich. Es kommen so genannte temperente Phagen vor, deren DNA sich reversibel in das Wirtsgenom einbaut und der Phage wird damit zum Prophagen. Hiermit wird die Wirtszelle vor nachfolgendem Befall durch dieses Virus geschützt, da die Phagenvermehrung durch den Prophagen aufgehalten wird. Der Prophage vermehrt sich weiter bei Zellteilungen als Teil des Wirtsgenoms. Das Bakterium wird als lysogen bezeichnet. In einigen Fällen wird der Phage wieder aktiv und beginnt einen lytischen Zyklus, der die Wirtszelle vernichtet (Cypionka, 2003).

## 2.2 *Escherichia coli* als Wirtsbakterium des Bakteriophagen T4

Die Anzahl der Wirtsbakterien eines Bakteriophagen ist oft sehr eng begrenzt. Meistens zur Vermehrung eines Phagen sind nur einzelne Stämme einer bestimmten Bakterienart geeignet. So zum Beispiel kann der Bakteriophage T4 nicht nur viele *E.coli*-Stämmen infizieren, sondern auch einige anderen Bakterienarten. Zum Vergleich ist die Vermehrungsfähigkeit des Bakteriophagen  $\Phi$ X 174 nur auf den *E.coli*-Stamm C beschränkt (Graw et al., 2010).

*Escherichia coli* ist ein nicht sporenbildendes, nicht säurefestes Stäbchenbakterium und ist zwischen 2,0 und 6,0  $\mu\text{m}$  lang und 1,1 bis 1,5  $\mu\text{m}$  breit. Laut der Systematik ist *Escherichia coli* ein gramnegatives Bakterium und gehört in die Klasse der Gamma-Proteobakterien und zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Zum ersten Mal wurde *Escherichia coli* von Theodor Escherich am Ende des 19. Jahrhunderts aus dem menschlichen Darm isoliert. In dieser Zeit hat er dieses Bakterium als *bakterium coli commune* bezeichnet. Neben der *Escherichia coli* gehören zu den *Enterobacteriaceae* (vom griechischen enteron - Darm) viele Darmbakterien und auch Krankheitserreger (*Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*). Durch die peritriche Begeißelung ist die meiste Zahl der Stämme beweglich. Selbe nicht pathogene *E. coli* ist ein wichtiges Markerbakterium, um bakterielle Verunreinigungen nachzuweisen.

Als Bestandteil der normalen Darmflora von Mensch und Tier ist *Escherichia coli* in der belebten und unbelebten Umwelt sehr verbreitet. Beim Geflügel ist *E. coli* meist in einer Keimzahl von  $10^6$  Kolonie-bildenden-Einheiten (KbE) pro Gramm Kot zu finden. Dabei geschieht die Übertragung von *E.coli* überwiegend horizontal, das heißt über erregerhaltigen Staub, Kot oder Wasser. Die vertikale Infektion mit den Bakterien erfolgt durch die aus einer *E. coli*-Infektion resultierende Salpingitis, welche eine Übertragung des Keimes auf das Ei ermöglichen kann. Ebenso kann die Infektion durch die mit Kot verunreinigte Eischale vorkommen. *Escherichia coli* wird auch oft im oberen Respirationstrakt und, in Abhängigkeit von der Kon-

tamination der Umwelt, auf den Federn und Haut des Geflügels gefunden (Mehrke, 2006, Böhland, 2007).

Bakteriophage T4 gehört zu den komplexen Phagen und besteht aus einem ikosaedrischen (nach griechischen Zwanzigflächner oder zwanzigflach) Capsid, der etwa 111 nm lang und 78 nm im Durchmesser groß, und langen Infektionsapparat (Phagenschwanz) mit kontraktile Hülle und zentraler Röhre. Zwischen dem Capsid und dem Phagenschwanz befindet sich ein Kragen mit 6 sogenannten „Whiskers“. Auf der Abbildung 4 ist dargestellt, wie der Phagen T4 durch die Schwanzfasern an den spezifischen Rezeptoren der *Escherichia coli* anhaftet.

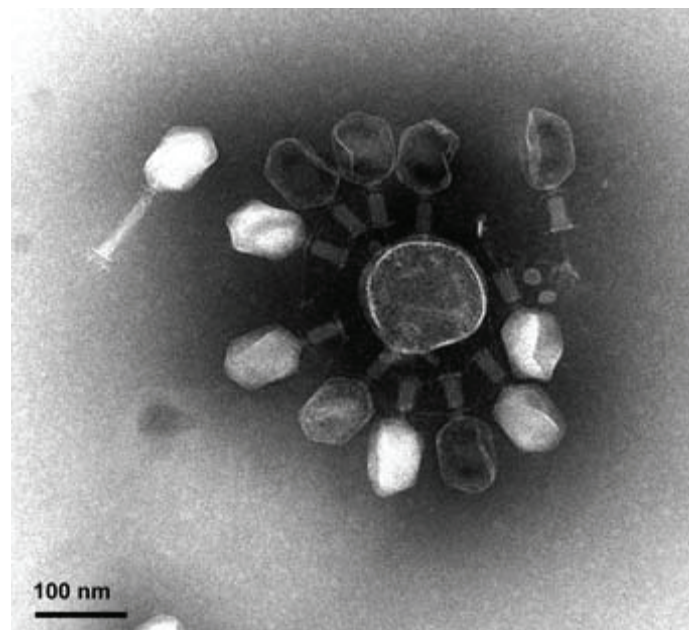


Abbildung 4: T4-Phagen greifen einen *Escherichia coli* Zelle an (Brüssow, 2009)

Im inneren des Kopfes befindet sich das Genom des T4-Phagen, der aus einem einzigen vollständig sequenzierten doppelsträngigen DNA-Molekül mit einer Länge von 168 903 Basenpaare besteht. Es umfasst etwa 300 Gene und macht 48% des Gewichtes des Virions aus. In der T4-Phagen-DNA kommt der glykosylierte 5-Hydroxymethyl-Cytosin statt normalen Cytosin vor, was einen wirksamen Schutz gegen bakterielle Nukleasen gewährleistet.

Die Infektion der *Escherichia coli* Zellen durch den Bakteriophagen T4 geschieht sehr schnell und höchst effektiv, wobei ungefähr jedes Virion auf einem Bakterienrasen eine Plaque bildet. Der Grund dafür ist ein besonders entwickelte Infektionsapparat, das die reversible Befestigung durch dessen Schwanzfäden an die Wirtzelloberfläche ermöglicht. Wiederholtes Anheften und Abdissoziieren einzelner Schwanzfäden ermöglichen es dem Phagen, die Bakterienzelle abzutasten, eine geeignete Infektionsstelle zu finden und schließlich irreversibel an



diese zu binden. Anschließend durch eine Kontraktion der Scheide wird die zentrale Röhre, die noch geschlossen ist, bis zu innere Zellmembran geschoben. Der hier vorhandene Phosphatdiglycerin bewirkt die Freigabe der Röhre für den weiteren Durchtritt der DNA in die Wirtszelle. Zur Übertragung seiner genetischen Information verwendet der Bakteriophage T4 die RNA-Polymerase der Wirtszelle. Die DNA wird von bakteriellen Enzymen transkribiert und translatiert. Die neu-entstandene Phagen-Polymerase repliziert nun die Phagen-Gene. Währenddessen beginnt die Synthese der Phagenhülle, in welche anschließend die replizierte DNA verpackt wird. Als letztes synthetisiert der T4-Phage ein spezifisches Lysozym, das die Zellwand des *E. coli* Bakteriums zerstört, wodurch die ca. 200 neuen fertigen Phagenpartikeln freigesetzt werden. Dies findet nach etwa 25 Minuten nach der Infektion statt (Depping, 2001, Cairns et al., 1972).

### **2.3 Mikrobielle Kontamination und Verderb der Lebensmitteln am Beispiel des Geflügels**

Verdorbenes Lebensmittel sind durch nachteilige Veränderungen gekennzeichnet, aufgrund deren sie für den menschlichen Verzehr ungeeignet geworden sind. Die Ursachen des komplexen Verderbnisprozesses sind sehr verschiedenartig und die Mechanismen ihres Zusammenwirkens noch nicht vollständig erforscht. Aufgrund mikrobieller Verderbnis verliert die Weltproduktion um etwa ein Drittel der Lebensmittel, was ökonomische Einbußen in Milliardenhöhe bedeutet. Generell wird Verderb als Veränderungen im Aussehen, Geschmack, Geruch oder Konsistenz definiert (Fehlhaber et al., 2005).

Wenn Mikroorganismen durch ihre Vermehrung und Stoffwechsel so die Eigenschaften der Lebensmittel verändern, dass sein Genusswert auffällig beeinträchtigt oder seine bestimmungsgemäße Verwendung überhaupt ausgeschlossen wird, spricht man über den mikrobiellen Verderb. Nicht in allen Fällen findet eine stoffliche Veränderung der Lebensmittelbestandteile statt. Hierdurch kann allein die massenhafte Anwesenheit von Bakterien an der Oberfläche des Lebensmittels durch die Klebrigkeit und Schleimigkeit den Verderb hervorrufen. Während des mikrobiellen Verderbs wird die abgestorbene, hochorganisierte organische Substanz in ihre Bausteine zerlegt, um dem Aufbau neuer, lebendiger Substanz zu begünstigen. Demgemäß kann man den mikrobiellen Verderb als Teil eines sinnvollen Kreislaufes der Natur bezeichnen. Dieser Vorgang ist zwangsläufig, wenn Lebensmittel die geeigneten Bedingungen zum Wachstum der Mikroorganismen bietet. Die auftretenden Veränderungen

sind durch die Substrateigenschaften des Lebensmittels und die spezifischen Stoffwechseleinstellungen der Mikroorganismen bestimmt. Die hängen von der Intensität, mit der sich die Verderbniskeime vermehren, ab. Mikrobieller Verderb kann somit nur dann auftreten, wenn das geeignete Substrat (das Lebensmittel) verfügbar ist und es mit der entsprechenden Flora besiedelt wird und diese die Möglichkeit hat, sich zu vermehren und Tätigkeit ausbreiten, die Verderbnisvorgänge verursachen. Wie zum Beispiel, Bildung mikrobieller Enzyme oder Bildung von Geruchs- und Farbstoffen.

Die wichtigsten Enzyme, die am Verderb der Lebensmittel beteiligen, sind extrazelluläre Lipasen, Proteasen, Carbohydrasen und Oxidoreduktasen. Nach ihrer Synthese werden diese Enzyme durch die Zellmembran der Mikroorganismen herausgeführt. Die intrazellulären Enzyme können nach dem Zelltod oder -Zerstörung weiter aktiv sein. Deren Auswirkungen spielen bedeutende Rolle bei dem Verderbnisprozess (Sinell, 2004).

Mossel (1995) hat den entscheidenden Parameter für das Wachstum der Mikroorganismen folgenderweise kategorisiert:

- „Intrinsic factors“, wie pH-Wert, Wasseraktivität, Redoxpotenzial, Anwesenheit antimikrobieller Substanzen und weitere physikalische, chemische und strukturelle Zusammensetzung des Lebensmittels.
- „extrinsic factors“ solche, wie Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit u.a.
- „implicit parameters“, die Zusammensetzung und Verhalten der Mikroflora im Lebensmittel bezeichnen
- Wege zur Haltbarmachung, wie Räuchern, Salzen, Säuern, Zusatz von Antioxidantien

Bei der Geflügelhaltung kann die Übertragung von Mikroorganismen über Kot und Einstreu, aber auch über das Ei geschehen. Sie kann sowohl horizontal, als auch vertikal sein. Nicht die letzte Rolle bei der Infektion mit pathogenen Mikroorganismen spielen Futtermittel. Jüngere Tiere werden den bakteriellen Infektionen öfter ausgesetzt, als alte. Die Kontamination des Geflügels mit Mikroorganismen kann unter anderem in den Produktionsstufen vor dem Schlachtprozess geschehen. Auch der Transport zur Schlachtung stellt eine Möglichkeit zur Erhöhung der Keimkontamination des Geflügels dar. So zum Beispiel steigt der Gehalt an *Escherichia coli* Keimen beim längeren Transport stark an.

Das Geflügel in Broilermastbetrieben ist der Kontamination mit Laktobazillen, Enterokokken, koliforme Bakterien, Hefen, Schimmelpilze ausgesetzt. Aus den Federn lebenden Schlachtgeflügels wurden Mikrokokken, unter anderem *Staphylococcus aureus*, isoliert. Diese Keime können auch verschiedenen Lebensmittelvergiftungen aufrufen. Die Mikroorganismen werden in zwei Gruppen eingeteilt: solche, die geringerer oder fakultativer Pathogenität aufweisen

(*Streptococcus faecalis*, coliforme Keime) und solche, die für Geflügel, Säugetiere und Mensch pathogen sind (Salmonellen, Listerien, Staphylokokken). Tabelle 1 stellt die meistens beim Geflügel vorkommenden bakteriellen und pilzlichen Erreger dar.

Tabelle 1: Bakterielle und pilzliche Mikroorganismen, die beim Geflügel vorkommen (Zickrick et al., 1987)

<b>Erreger</b>	<b>Hauptsächliches Vorkommen</b>	<b>Krankheit</b>	<b>Bemerkungen</b>
Salmonellen, z.B. <i>S. typhimurium</i> , <i>S. agona</i> , <i>S. infantis</i>	Huhn, Pute, Taube, Ente	Salmonellose	
<i>Salmonella gallinarum</i> - <i>pullorum</i>	Huhn	Pullorum-Krankheit	
<i>Escherichia coli</i>	Huhn, Pute	Kolibazillose	
<i>Mycobacterium avium</i>	Huhn	Tuberkulose	
<i>Pasteurella Pseudotuberculosis</i>	Pute	Pseudotuberkulose	
<i>Pasteurella multocida</i>	Huhn, Pute	Geflügelcholera	
<i>Mycoplasma spec.</i>	Pute	Mykoplasmosse	
<i>Haemophilus gallinarum</i>	Huhn	Geflügelschnupfen	
<i>Pasteurella septicaemia</i>	Gans	Gänseinfluenza	
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Pute	Rotlauf	Zoonose
<i>Listeria monocytogenes</i>	Huhn, Pute, Taube, Ente	Listeriose	Zoonose
Staphylokokken	Huhn, Pute	Mikrokokkose	Lebensmittel- vergiftung
<i>Streptococcus gallinarum</i>	Huhn, Pute	Streptokokkose	
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Huhn, Pute	Infektiöse Gelenk- entzündung	
Salmonellen, Pasteurellen, Coli-Keime	Huhn	Eileiterentzündungen	
<i>Pasteurella anatipestifer</i>	Ente	Neur duck disease	



Während der Schlachtung des Geflügels besteht die Möglichkeit der Kontamination der Schlachtkörper mit verschiedensten Keimen. Die dabei auftretende Keimbelastung unterliegt großen Schwankungen, die von der Kontamination des Ausgangsmaterials abhängen. Während der Anlieferung des Geflügels zur Schlachtung können die Mikroorganismen, die während der Haltung dominieren, vermehren und auf andere Tiere übertragen werden. Die Hauptrolle dabei spielen *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* und Salmonellen.

Die Betäubung und Entblutung des Geflügels hat große Bedeutung für späteren Keimgehalt. Bei nicht entsprechender Betäubung kommt es zu Reflexbewegungen der Tiere, was ein Aufsaugen des sehr keimhaltigen Brühwassers in Lunge und Luftsäcke und eine Kontamination des Kreislaufsystems aufrufen kann. Nach der Betäubung und Entblutung müssen die Schlachtkörper gerupft werden. Dies geschieht mittels des Brühwassers, wobei die Federn in den Federfollikeln gelockert und danach maschinell entfernt werden. In der Praxis werden Brühtemperaturen zwischen 50°C und 60°C angewendet. Allerdings reichen die zur Abtötung lebensmittelhygienisch bedeutsamer Keime nicht aus. Aufgrund der äußeren Verschmutzung des Geflügels verteilen sich während des Brühens die von der Oberfläche der Schlachtkörper abgespülte Keime im Brühwasser. Demzufolge führt es zur gegenseitigen Kontamination der Schlachtkörper. Bei Broilern konnten  $10^8$  bis  $10^{10}$  abspülbare Mikroorganismen gefunden werden. Der größte Anteil davon haben die *Enterobacteriaceae* ausgemacht, was auf eine äußerliche Verschmutzung mit Kot deutet. Es wurde nachgewiesen, dass die Mikroorganismen, die sich bei Brühwassertemperatur von 55°C noch vermehren können, zu einer nicht mehr zu beseitigenden inneren Kontamination übergehen.

Für die Vermeidung einer Keimanreicherung auf dem Schlachtkörper soll man diese nach dem Brühen duschen, wodurch die an der Oberfläche anhaftenden Keime abgespült werden. Jedoch die Keime, die sich in tieferen Schichten der Haut befinden, werden dadurch nicht beeinflusst und in späteren Phasen der Schlachtung auch nicht entfernt.

Nach dem Rupfen aufgrund einer Kreuzkontamination während der mechanischen Einwirkung der Rupffinger auf eine Vielzahl von Schlachtkörpern können die gleichen Keime gefunden werden wie nach dem Brühen. Ebenso die nach dem Entfernen der Federn in der Haut gebliebenen Öffnungen können das Eindringen der Keime begünstigen.

Die stärkste Kontamination der Schlachtopfer mit Mikroorganismen geschieht bei der Eröffnung der Leibeshöhle. Durch unangemessene Arbeiten kann Darminhalt auf die Oberfläche von Bauchhöhle und Haut kommen, was in der Folge starke Keimanreicherung beeinflusst. Vor allem kommt es zu einem starken Anstieg der *Enterobacteriaceae*. Diese meist oberfläch-

liche Kontamination lässt sich durch unmittelbar anschließendes Sprühduschen wieder verringern.

Die anschließende Sprühkühlung und das Schockgefrieren sollen eine deutliche Verminderung der Keimkontamination gewährleisten.

Die äußere Haut der Schlachtkörper weist im Durchschnitt einen Keimgehalt von  $10^4$  bis  $10^6$  Keimen pro Gramm auf. Die bakterielle Kontamination der Muskulatur liegt bei  $10^4$  Keimen pro Gramm und zeigt damit einen relativ hohen Wert. Die Muskulatur der Schenkelpartien gegenüber der Brustmuskulatur ist höher kontaminiert, wobei es die Vertreter der Familie *Micrococcaceae* (*Staphylococcus aureus*) sowie Streptokokken, gramnegative Stäbchen und aeroben Sporenbildner gefunden werden (Zickrick et al., 1987).

#### **2.4 Verwendung von Bakteriophagen zur Kontrolle pathogener Bakterien und Verderbniserreger in Lebensmitteln**

Die Bakteriophagen werden oft für die biologische Kontrolle und zielgerichtete Bekämpfung pathogener Bakterien eingesetzt. Die Anwendung der Bakteriophagen für diese Zwecke wird als Phagentherapie bezeichnet. Nach der Erfindung der Phagentherapie durch Félix d'Herelle die neue Welle der Phagenforschung wurde Mitte des 20. Jahrhunderts wieder angefangen. Dies ist vermutlich von der Entdeckung der Antibiotika durch Fleming und Waksman abhängig. Diese Zeit wurden viele Funktionsweise der Phagen und wichtige Parameter für einen erfolgreichen Infektionsverlauf noch nicht ausreichend erforscht, weswegen nicht alle Versuche zur Phagentherapie positiv waren. Hingegen war die Wirksamkeit der Antibiotika so überzeugend, dass in den 80er Jahren Infektionskrankheiten als „besiegt“ angesehen wurden. Mit Laufe der Zeit sind die Bakterien gegenüber vielen Antibiotika resistent geworden und in einigen Fällen sind sogar multiresistente Stämme entstanden. Diese Resistenz entwickelt sich und wird durch verschiedene Mechanismen des horizontalen Gentransfers und der Mutation beschleunigt. Besonders in der Medizin spielt die Multiresistenz der Bakterien eine große Rolle und macht ein großes Problem bei der Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten. In diesem Zusammenhang können die Bakteriophagen eine vielversprechende Alternative zur Behandlung sein. Allerdings, da die Zulassung neuer Medikamenten in Europa und den USA sehr zeit- und kostenintensiv ist, wurde die bisher entwickelte Phagentherapie nur im Lebensmittel- und Veterinärbereich eingesetzt. Zurzeit sind einiger weniger Bakterienphagenpräparationen durch die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) und des US

Department of Agriculture (USDA) zur Bakterienbekämpfung zugelassen. Diese kommerziell erhältliche Produkte erlauben die Kontrolle von *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* und *Staphylococcus aureus* (Heller et al., 2011)

Es wurde schon einmal erwähnt, dass die Bakteriophagen im ganzen einen engen Bereich der Wirtsbakterien haben, der gewöhnlich durch nur eine Familie oder eine Gattung oder, was öfter ist, durch bestimmten Bakterienstämme begrenzt ist. Am besten mit biologischer Kontrolle der Bakterien kommen solche Bakteriophagen zurecht, die über den breitesten Bereich verschiedener Wirtsbakterien verfügen. Diese Phagen nennt man polyvalent oder WHR-Bakteriophagen (wide host range), insofern die üblicherweise gegen vielen verschiedenen Bakterienarten aktiv sind (O'Flaherty et al., 2005, Bielke et al., 2007). Hierdurch kann man solche unspezifischen Phagen für die Beseitigung der oder jener Bakterienart in den Lebensmitteln verwenden.

Eine Menge der äußeren Faktoren kann die Fähigkeit der Phagen zur Adsorption und Infektion des Wirtsbakteriums beeinflussen. Als wichtiges werden hier die Art des Wirtsbakteriums und die Anzahl der Phagen angesehen. Meiste Information über die Anwendung der Bakteriophagen findet man in den Beschreibungen von Experimenten, wo eine hohe Anzahl eines Phagenstamms wird gegen eine Bakterienart ( $10^7$  -  $10^8$  Zellen pro ml) gerichtet. O'Flynn et al. (2004) verwendeten eine Mischung von drei verschiedenen Arten der Bakteriophagen, um Rindfleisch zu behandeln, welche mit  $10^3$  KBE pro g der *E. coli* O157:H7 kontaminiert wurde. Nach dem Einsatz des Phagencocktails in sieben von neun Proben konnten keine lebensfähigen *E. coli* Zellen festgestellt werden. Es wurde auch dabei die Entstehung von phagenresistenten *E. coli* Varianten mit deutlich veränderter Zellform beobachtet. Die resistenten Zellen waren kleiner und ähnelten eher den Kokken. Im Beispiel mit der *Salmonelle* zeigten Bigwood et al. (2008) ebenfalls eine wirksame Beseitigung von *Salmonelle* Zellen, wobei  $10^4$  Zellen pro g angesetzt wurden. Die oben genannten Studien zeigen an, dass die Anwendung von Bakteriophagen in Lebensmitteln, um unerwünschte, in nicht großen Mengen vorhandene Bakterien zu beseitigen, erfolgreich sein könnte. Jedoch ist dies wahrscheinlich von der Anwesenheit der Flüssigkeit in Lebensmitteln abhängig, was die Beweglichkeit der Bakteriophagen begünstigt.

Bakteriophagen können auf der Oberfläche der Lebensmitteln, einschließlich Schlachtkörper und Fleisch, gefunden werden. Die Voraussetzung dafür ist die Anwesenheit der Wirtsbakterien. Die Wirtsbakterien schließen Darm- und Hautbakterien, sowie in tierischen Lebensmitteln vorhandene pathogene und nicht pathogene Bakterien mit ein. Bakteriophagen können in

zwei verschiedenen Herangehensweisen - in einem passiven oder aktiven Verfahren - angewendet werden. In dem passiven Verfahren werden Bakteriophagen in ausreichender Menge verwendet, um möglichst alle Zielbakterien durch primäre Infektion oder durch die Lysis zu bekämpfen. Jedoch ist höhere Anzahl der Bakteriophagen erforderlich, um sogar niedrige Populationsdichte von empfindlichen Bakterien zu beseitigen. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass, insofern vieles dabei von der Lysis der Zelle abhängt, natürlicher Widerstand der Wirtsbakterien anhand der Anwesenheit von Restriktionsenzymen nicht das Problem sein soll. Bei dem aktiven Verfahren wird relativ kleine Menge von Bakteriophagen benötigt, um eine wirksame Beseitigung der unerwünschten Bakterien zu gewährleisten, da die Meisten davon werden durch die sekundäre Infektion aufgrund der Replikation und Transmission von benachbarten Zellen getötet. Die Vermehrung der Bakteriophagen zwischen den empfindlichen Wirtsbakterien kann durch das ungeeignete Umgebungsmedium oder durch die Anwesenheit zahlreiche inaktive Bakterien verhindert werden.

Bakteriophagen werden im Fleisch und Fleischerzeugnissen gezielt auf die Reduzierung der Population von pathogenen und Verderbnisbakterien verwendet. Obwohl die Anwendung von Bakteriophagen für die Biokontrolle in verschiedenen Lebensmittelarten studiert wurde, haben sich die meisten Studien auf das Geflügel-, Rind- und Schweinefleisch konzentriert. Einige mathematische Modelle der Wechselwirkungen "Phage-Wirtsbakterium" weisen darauf hin, dass eine minimale Anzahl von Wirtsbakterien für die Vermehrung von Phagen und anschließenden effektiven Reduzierung der Zielbakterien erforderlich ist (Andreoletti et al., 2009).

Eine Studie zeigte, dass die Bakteriophagen keine bedeutsame Wirkung auf die Zahl und Aktivität der im flüssigen Milieu befindlichen Bakterien haben, wenn die Anzahl der Wirtsbakterien unter  $10^4$  KbE liegt (Wiggins et al., 1985). Jedoch sind solche Rückschlüsse nicht universell, und die anderen Studien über Kontrolle der Verderbnisbakterien auf der Fleischoberfläche weisen darauf hin, dass die wirksame Biokontrolle durch die Bakteriophagen nur bei der Wirtszellenanzahl nicht mehr als 46 KbE pro  $\text{cm}^2$  stattfinden kann (Greer, 2006). Solche sich widerstreitende Ergebnisse können von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden, wie z.B. die Kombination Phage-Wirtsbakterium, die verwendete Lebensmittelart oder die Anwesenheit von Nicht-Wirtsbakterien. Hierdurch soll die Effektivität der auf den Phagen basierenden Biokontrolle versuchsweise abhängig von dem bestimmten Fall festgestellt werden.

Geflügelerzeugnisse sind wohl am meisten verwendetes Fleisch, um die Effektivität der durch Phagen gewährleisteten Biokontrolle in Lebensmitteln zu studieren. Geflügel und Eier sind wichtige Quellen der für die Menschen pathogenen Bakterien. Die Bakterien der Gattung

*Campylobacter* und *Salmonella* sind am häufigsten in dem Hühnerfleisch anzutreffende Mikroorganismen.

Die bedeutende Reduzierung der Anzahl von *Campylobacter jejuni* und *Salmonella* Enteritidis mittels der Behandlung mit den Phagen wurde auf der künstlich kontaminierten Haut von den Schlachtkörpern der Hühner festgestellt (Goode et al., 2003, Atterbury et al., 2003). Goode et al. (2003) haben eine vollständige Beseitigung von *Salmonella* Enteritidis durch die Behandlung mit dem virulenten Bakteriophagen 12 erreicht. Bei dem Zusatz der Phagen in höheren Mengen wurden sogar *Salmonella* Nicht-Wirtsstämme entfernt. Ursache dafür könnte sogenannte die „lysis from without“ sein. Dabei handelt es sich um eine Adsorption des Phagen an die Zelloberfläche und anschließender Penetration der Zellwand. Obwohl die Phagen nicht in der Lage sind intrazellulär zu vermehren, verursacht die Perforation der Zellwand eine Desintegration und Lyse (Heller et al., 2011). Als Beispiel für die Untersuchung der Wirksamkeit der Phagentherapie gegen Darminfektionen mit *Campylobacter jejuni* zeigten Wagenaar und Kollege, dass der virulente Bakteriophage 17 die Keimzahlen entsprechender Bakterien um bis zu drei Zehnerpotenzen reduzieren kann. Nach fünf Tagen haben sich die Werte zwar erhöht, aber sind konstant um etwa 90 % unter denen der Kontrollprobe geblieben. Es wurde auch festgestellt, dass die Phagen innerhalb von fünf Tagen unabhängig von der Anwesenheit der Wirtszellen im Hühnerkot nachweisbar waren (Wagenaar et al., 2005). Bei der Studie von Atterbury und Kollegen (2003) wurde nachgewiesen, dass das Einfrieren der Hühnerhaut nach der Anwendung von Bakteriophagen für die Reduzierung der Keime *Campylobacter jejuni* effektiver, als die andere unabhängig davon angewendete Methoden, war. Ebenso Greer et al. (1983) haben bei der Isolierung von 21 *Brochothrix* Phagen festgestellt, dass die Effektivität der Infektion bei niedrigen Temperaturen signifikant erhöht wurde. Bei der Behandlung von kontaminiertem Fettgewebe mit Phagen bei 6°C wurde eine deutliche Reduzierung von *B. thermosphacta* um 99 % bemerkt.

Das Problem der Infektion der bedeutenden Zahl der Hühner und der Puten durch Salmonellen, *Campylobacter* oder anderen pathogenen Keimen besteht wahrscheinlich darin, dass eine große Menge von Art und Weisen der Ansteckung des Geflügels (Umwelt, Kot, andere Tiere usw.) vorhanden ist. Insgesamt haben die Bekämpfungsmethoden mit pathogenen Keimen mittels der Bakteriophagen Anzahl der Keime quantitativ verringert, aber den krankheitserregende Mikroorganismen nicht völlig beseitigt.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Geräte und Materialien

Es wurden folgende Nährmedien und Materialien verwendet:

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO-Agar) (pH $7,3 \pm 0,2$ bei $25^{\circ}\text{C}$ )	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Sojapepton-Caseinpepton-Bouillon (CASO-Bouillon) (pH $7,3 \pm 0,2$ bei $25^{\circ}\text{C}$ ) Agar-Agar	Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH, Berlin Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Kochsalzlösung (0,85 %-ig)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Phagenpuffer (empfohlene pH-Wert $\approx 7,5$ ) Zusammensetzung: $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,3 \text{ g}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 0,56 \text{ g}$ $\text{NaCl} = 0,4 \text{ g}$ dest. Wasser = 100 ml	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Phage T4 DSM No.: 4505	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Probe: Hähnchenbrustfilet	Landjunker Handelsklasse A Gebr. Stolle GmbH & Co. KG

Bei den Versuchsdurchführungen wurden folgende Arbeitsgeräte und Kleinmaterialien benutzt:

Arbeitsgeräte:

Analysenwaage	Sartorius ED 2201-CW
Photometer	Spectronic Instruments
Reagenzglasmixer	Heidolph REAX top
Schüttler	Edmund Bühler GmbH
Zentrifuge	SIGMA Laboratory Centrifuges
Homogenisator	MIX 1
	Kleinfeld Labortechnik, Omnilab
Autoklav	Thermo Scientific
Brutschrank	Heraeus INSTRUMENTS
Koloniezählgerät	(MASSI, KZG 01)

Kleinmaterialien:

Reagenzgläser, kleine Reagenzgläser, Petrischalen, Pipetten, Pipettenspitzen, Drigalski-Spatel, Bunsenbrenner, Reagenzglasständer, Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Schraubflaschen, Küvetten (1,5ml), Reagenzröhrchen, sterile Plastikbecher, Eppendorfgefäße, Zentrifugierungsröhrchen, Pinzette.

### **3.2 Züchtung der T4-Phagen in Flüssigkultur mit anschließender Aufbewahrung des Phagenlysats**

Als Originallysats für die weitere Züchtung der T4 Phagen wird einer von der „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ genommen.

Zunächst am Tag vorher wird die Vorkultur von *Escherichia coli* K12 in 25 ml Sojapepton-Caseinpepton-Bouillon angesetzt, in den Schüttler gestellt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wird wie folgt weitergearbeitet:

- Zwei Erlenmeyerkolben (Kontrolle und Phage T4) mit 25 ml Sojapepton-Caseinpepton-Bouillon werden mit den 250 µl der Vorkultur angeimpft.



- Von beiden Kolben wird je eine Probe genommen und von denen eine optische Dichte (OD) bei 650 nm gegen Wasser gemessen. Die bekommene Zahl wird als Null-Punkt für die Wachstumskurve angenommen.
- Die Kolben werden in den Schüttler gestellt und bei 37°C, 130 rpm inkubiert. Jede 30 Minuten wird von beiden Kolben je eine Probe genommen (die Kolben sollen nicht von dem Schüttler entnommen werden), die optische Dichte bestimmt und die erhaltende Zahl in die Wachstumskurve eingebracht.
- Von den genommenen Proben wird die Gesamtkeimzahl auf den Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar-Platten bestimmt (Verdünnungsstufen von  $10^3$  bis  $10^5$  werden für die Untersuchung genommen).
- Für die weiteren Untersuchungen wird der Phagentiter des Originallysats bestimmt:
  - Es wird eine Verdünnungsreihe des Lysats hergestellt (Verdünnungsstufen  $10^3$ - $10^9$  werden für weitere Behandlungen benutzt).
  - Die 100  $\mu$ l von der Vorkultur von *Escherichia coli* K12 werden mit 100  $\mu$ l der Verdünnungen des Lysats und mit 5 ml des Weichagars zusammengemischt.
  - Die Mischung wird gleichmäßig auf die Agarplatten gebracht und bei 37°C 24 Stunden inkubiert.
- Bei dem Zeitpunkt, wenn die OD gleich 0,3 ist, nimmt man die Probe von einem Kolben für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl. In den anderen Kolben werden 50  $\mu$ l T4-Phagenlysats zugesetzt.
- Die Kolben werden weiter bei 37°C und 120 rpm geschüttelt und inkubiert. Die Wachstumskurve wird weiter gezeichnet.
- Falls die Wachstumskurve von Phage T4 ist zusammengebrochen und von der Kontrolle in die stationäre Phase übergegangen, wird der Experiment beendet und die Kolben aus den Schüttler genommen.
- Zum Kolben mit dem T4-Phagenlysats werden 2 Tropfen von Chloroform gegeben, um die Phagen freizusetzen. Der Kolben wird in den Schüttler für 30 min bei 37°C gestellt.
- Nachfolgend wird die Lösung mit T4-Phagen bei 6000 rpm 10 Minuten zentrifugiert und den Überstand in den sterilen Becherglas ausgegossen.
- Von dem Überstand wird der Phagentiter bestimmt (Phagentiter 1) und ein Teil von dem Phagenlysats wird mit dem Phagenpuffer in Eppendorf-Gefäßen bei 4°C aufbewahrt.



- Der gebliebene Überstand soll weiter 30 Minuten bei 18 430 rpm zentrifugiert werden. Der enthaltene Überstand wird entsorgt, der Phagen enthaltende Rückstand sorgfältig aufgenommen und mit 0,5 ml Phagenpuffer gemischt.
- Von der Mischung wird der Phagentiter bestimmt (Phagentiter 2).
- 148 µl enthaltenden Phagenlysats werden mit 200 µl Glycerin (87 %) zusammengesetzt.
- Die Mischung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.
- Anschließend wird der Lysat im flüssigen Stickstoff schock gefriert und bei -80°C 2 Wochen gelagert.

### 3.3 Behandlung von Hähnchenbrustfilets mit *Escherichia coli* K12

Als Probe wurde das Hähnchenbrustfilet von der Firma Landjunker genommen.

Am vorherigen Tag wird die Vorkultur von *Escherichia coli* K12 in 25 ml Sojapepton-Caseinpepton-Bouillon angesetzt, in den Schüttler gestellt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wird wie folgt weitergearbeitet:

- Die erhaltene Vorkultur wird bei 6000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird entsorgt und das Pellet wird in den 25 ml 0,85 %-ige NaCl-Lösung aufgenommen.
- Von der bekommenden Lösung wird die Gesamtkeimzahl (GKZ 1) bestimmt.
- Ein Teil des Hähnchenbrustfilets wird in 10 möglichst gleiche Stücke aufgeschnitten und in zwei Gruppen (I und II) je 5 Stück geteilt.
- Jede Gruppe wird in ein Becherglas mit 500 ml NaCl-Lösung eingebracht. Die Gruppe I ist die Kontrolle und in das Becherglas mit der Gruppe II wird zusätzlich 50 µl von der Vorkultur *Escherichia coli* K12 zugesetzt.
- Zwei Bechergläser werden bei der Raumtemperatur 10 Minuten geschüttelt.
- Von dem Becherglas mit der Gruppe II wird eine Probe eingenommen und davon die Gesamtkeimzahl (GKZ 2) bestimmt.
- Für die weitere Tätigkeit soll jedes Stück des Filets mit der NaCl-Lösung homogenisiert werden. Dafür wird jedes Stück in 9 Teile NaCl-Lösung hineingebracht und 120 Sekunden homogenisiert.
- Von jeder Probe (10 Stück) wird die Gesamtkeimzahl (GKZ 3) bestimmt, um ein durchschnittliches Wert zu erhalten.

## 4 Auswertung der Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Züchtung der T4-Phagen in Flüssigkultur mit anschließender Aufbewahrung des Phagenlysats

Bei der Zugabe von Phagen einer Bakterienkultur in hinreichender Konzentration, kann man bei Messung der optischen Dichte beobachten, dass nach dem Beginn normalen Wachstumsverlaufs, eine Verzögerung des Wachstums auftritt. Nachfolgend hört das Wachstum auf, mit entsprechendem Sinken der Trübungswerte. Da immer mehr Bakterien lysieren, klärt sich die Bakterienkultur immer auf. Die Anzahl der Phagen im Medium bzw. Zahl der phagenhaltigen Wirtszellen in einem Plattentest bleibt zunächst längere Zeit konstant. Diese Zeit wird als Latenzperiode bezeichnet und bedeutet die Minimalzeit zwischen der Adsorption der Phagen an die Wirtszelle und der Lyse der Wirtszelle. Nach der Latenzperiode nimmt die Plaqueanzahl sprunghaft um über eine Zehnerpotenz zu und bleibt dann wieder annähernd unverändert. Die plötzlich losgewordenen Phagen („Wurf“) stecken ca. 99 % der vorhandenen Zellen an. Im weiteren Zeitverlauf kommt ein zweiter steiler Anstieg vor. Da die Nachkommen der Phagen des ersten Zyklus nicht alle gleichzeitig die Bakterien infizieren und lysieren, sieht die zweite Stufe unschärfer aus (Süßmuth et al., 1999).

Im vorliegenden Experiment wurde versucht, die Phagen T4 zu züchten und zu vermehren. Als Wirtsbakterium dafür wurde *Escherichia coli* K12 verwendet. Mittels zweier Probeversuchen wurde die im Abschnitt 3.2 beschriebene Arbeitsfolge zusammengestellt.

Die Abbildung 5 stellt die Graphik mit der Wachstumskurve dar, die während des Experiments aufgezeichnet wurde. In der Graphik ist zu sehen, dass die Wachstumskurve der Probe, in die der Phagenlysats zugesetzt wurde, stark abgebrochen ist. Dies deutet auf die Vermehrung der Phagen und das Absterben der Zellen hin. In der Anlage A ist zusätzlich eine Tabelle mit den Werten der gemessenen optischen Dichte dargelegt.

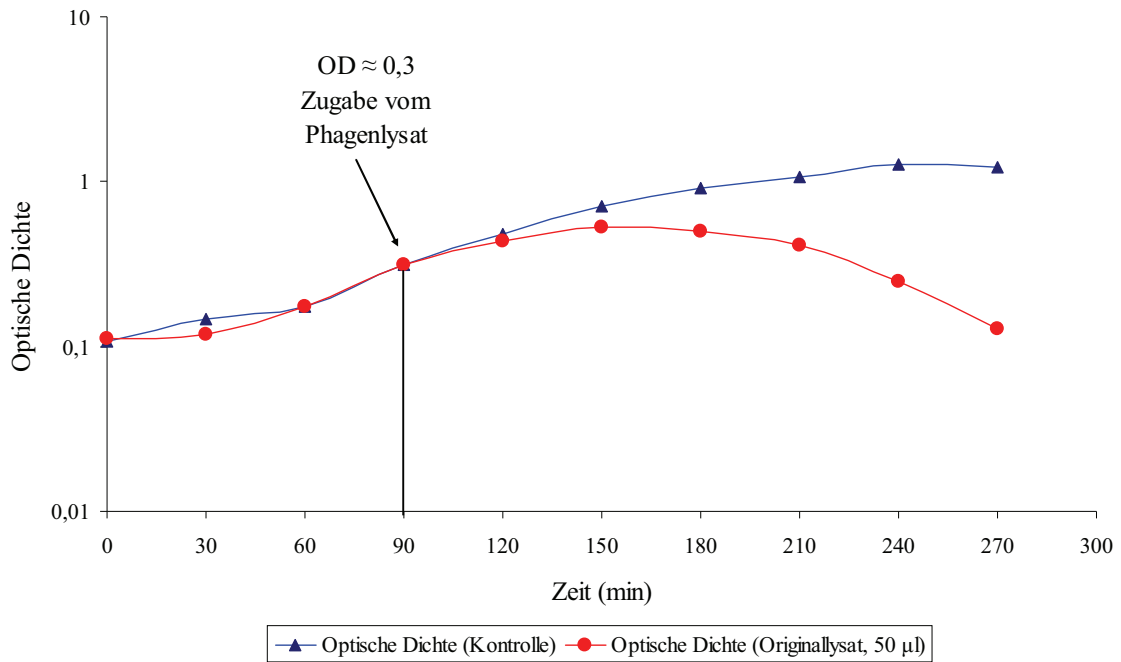


Abbildung 5: Wachstumskurve von *Escherichia coli* K12

Die Gesamtkeimzahl wurde am Anfang des Experiments (Null-Punkt) und unmittelbar vor der Eingabe des Phagenlysats (nach 90 Minuten) bestimmt. Bei der Untersuchung der Agarplatten wurden folgende Ergebnisse ermittelt, die in der Tabelle 2 dargestellt sind.

Tabelle 2: Gesamtkeimzahl am Anfang des Experiments und vor der Eingabe des Phagenlysats für die Züchtung der T4 Phagen

	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$	<b>Gewichteter Mittelwert</b>
Gesamtkeimzahl (Null-Punkt)	n.a.	76	7	n.a.	n.a.	n.a.	$7,54 \cdot 10^6$ KBE/ml
Gesamtkeimzahl (nach 90 Minuten, OD $\approx$ 0,3)	n.a.	n.a.	139	33	9	n.a.	$1,63 \cdot 10^8$ KBE/ml

Anhand der Tabelle 2 ist es klar, dass die Gesamtkeimzahl der Bakterien sich vergrößert hat bzw. die Bakterien haben sich vermehrt. Dies kann man auch auf den Abbildungen 6 und 7 sehen.

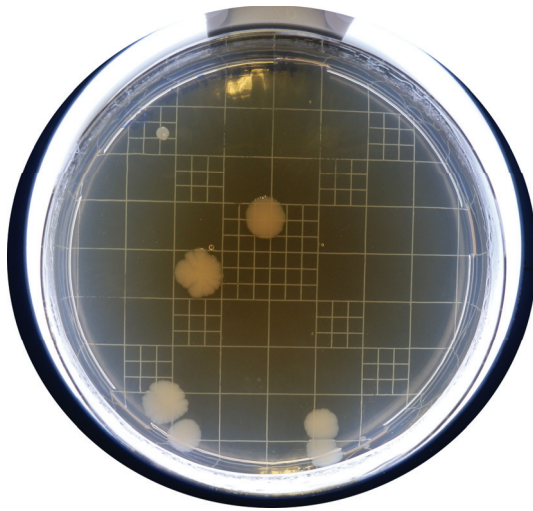


Abbildung 6: Gesamtkeimzahl der *Escherichia coli* K12 beim Null-Punkt.  
Verdünnungsfaktor:  $10^5$

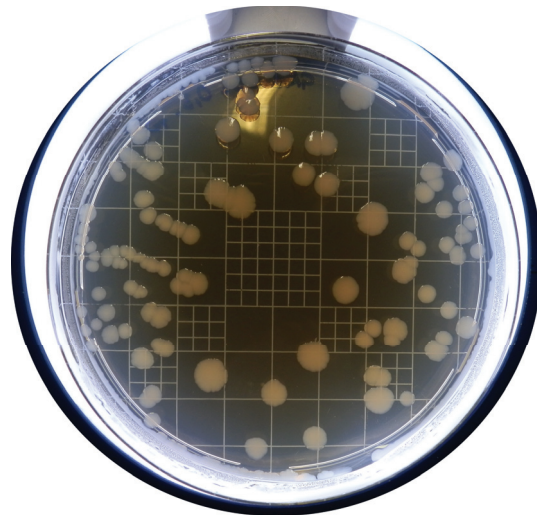


Abbildung 7: Gesamtkeimzahl der *Escherichia coli* K12 bei  $OD \approx 0,3$ .  
Verdünnungsfaktor:  $10^5$

Der Phagentiter wurde sowohl von dem Originallysat, als auch von dem während des Experiments erstellten Probenlysat bestimmt. Dabei der Originallysat wurde in der Menge von 50  $\mu\text{l}$  dazugegeben und die Menge des entstandenen Probenlysat machte 23 ml aus. Die Werte in der Tabelle 3 stellen die Anzahl der Plaque bildenden Einheiten pro Milliliter im Original- und Probenlysat dar.

Tabelle 3: Anzahl der Plaque bildenden Einheiten pro Milliliter im Originallysat und im Probenlysat nach der Züchtung von T4 Phagen.

	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$	$10^9$	$10^{10}$	Gewichteter Mittelwert
Originallysat	n.a	n.a	701	100	12	1	n.a.	$7,33 \cdot 10^9$ PbE/ml
Probenlysat (Phagentiter 1)	n.a	n.a	n.a	596	66	8	2	$6,05 \cdot 10^{10}$ PbE/ml

Nach der zweiten Zentrifugierung und anschließender Zugabe vom Phagenpuffer hat man wieder Phagentiter bestimmt (Phagentiter 2). Ebenfalls wurde der Phagentiter des Probenlysat (Phagentiter 3) nach 2 Wochen der Aufbewahrung bei  $-80^\circ\text{C}$  ermittelt. Zum Vergleich hat man den Lysat nach der ersten Zentrifugierung 2 Wochen im Puffer bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert und nachher den Phagentiter (Phagentiter 4) von diesem bestimmt. Tabelle 4 stellt die erhaltenen Werte dar.

Tabelle 4: Phagentiter 2 und Phagentiter 3 des Probenlysats

	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$	$10^9$	$10^{10}$	Gewichteter Mittelwert
Probenlysats (Phagentiter 2)	n.a	n.a	n.a	n.a	841	173	18	$9,3 \cdot 10^{11}$ PbE/ml
Probenlysats (Phagentiter 3)	812	87	5	2	n.a.	n.a.	n.a.	$8,1 \cdot 10^7$ PbE/ml
Probenlysats (Phagentiter 4)	n.a.	n.a.	n.a.	529	n.a.	n.a.	n.a.	$5,3 \cdot 10^{10}$ PbE/ml

Alle in der Tabelle 4 dargestellten Werte beziehen sich auf 1 ml. Da bei dem Experiment verschiedene Volumina der Lysate eingesetzt wurden, muss man für die Bestimmung der absoluten Anzahl der Phagen Nachberechnungen durchführen, die in der Tabelle 5 veranschaulicht sind.

Tabelle 5: Anzahl der Phagen nach dem Versuch der Züchtung von T4 Phagen

	Volumen (ml)	Konzentration der Phagen (PbE/ml)	Anzahl der Phagen (PbE)	Anreicherungs- bzw. Verlustfaktor
Originallysats	0,05	$7,33 \cdot 10^9$	$3,7 \cdot 10^8$	-
1. Zentrifugierung (Phagentiter 1)	25	$6,05 \cdot 10^{10}$	$1,5 \cdot 10^{12}$	4000
2. Zentrifugierung (Phagentiter 2)	0,8	$9,3 \cdot 10^{11}$	$7,44 \cdot 10^{11}$	2000
Gefrieren mit Glycerin (Phagentiter 3)	1,74	$8,1 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^8$	0,4

Laut der Ergebnisse aus der Tabelle 5 ist zu sehen, dass die Anzahl der Phagen nach der Züchtung um ca. vier Zehnerpotenzen zugenommen hat. Die Konzentration nach jedem Zentrifugierungsvorgang erhöhte sich um eine Zehnerpotenz und im Endeffekt war ein Anreicherungsfaktor von 2000 erreicht.

Laut der Literaturangaben (Depping, 2001) werden ca. 200 neue Phagenpartikeln aus einer Zelle freigesetzt. In dem vorliegenden Versuch vor der Zugabe des Phagenlysats wurde eine Gesamtkeimzahl von  $1,63 \cdot 10^8$  KbE/ml festgestellt. In den 23 ml der Originalkultur waren

somit  $3,7 \cdot 10^9$  KbE vorhanden. Demgemäß lässt sich ein theoretische Wert der Phagenanzahl errechnen:

$$3,7 \cdot 10^9 \text{ KbE} \cdot 200 \text{ Phagen} = 7,4 \cdot 10^{11} \text{ Phagenpartikeln}$$

Beim Vergleich mit dem praktischen Wert von  $1,5 \cdot 10^{12}$  PbE kann man zusammenschließen, dass die Vermehrung der Phagen gut gelungen hat. Obwohl soll man die entsprechenden Abweichungen, wie z.B. die Ungenauigkeit der Phagentiter- und/oder Gesamtkeimzahlbestimmung, auch berücksichtigen. Auf die gute Vermehrung weist ebenso der Wert von Multiplicity of Infection hin (s. S 33). Die Abbildungen 8 und 9 weisen ebenfalls auf die Erhöhung der Phagenkonzentration.

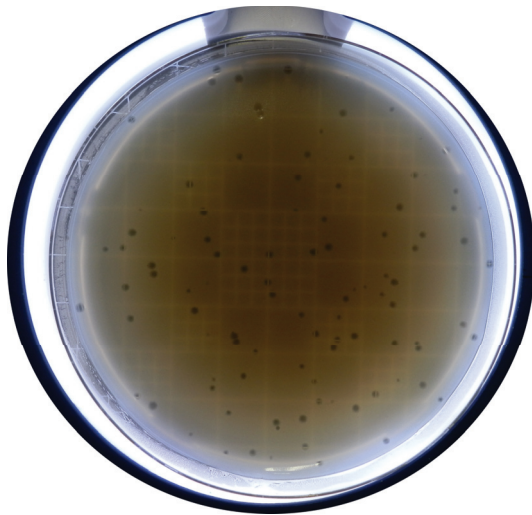


Abbildung 8: Phagenkonzentration im Originallysat. Verdünnungsfaktor:  $10^7$

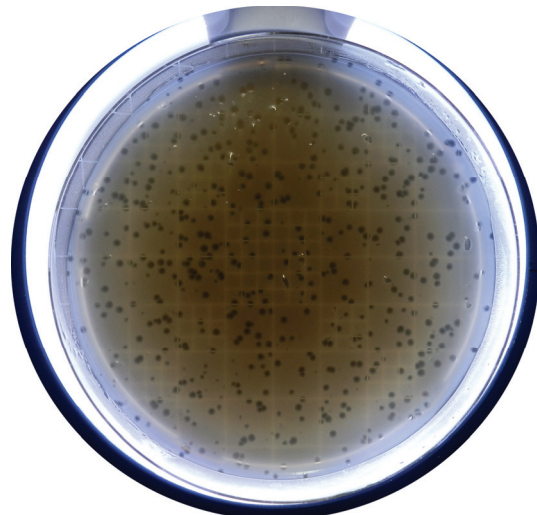


Abbildung 9: Phagenkonzentration im Probenlysat (Phagentiter 1).  
Verdünnungsfaktor:  $10^7$

Folgende Abbildung stellt den Unterschied zwischen der Klarheit des Phagenlyсата und der Kontrolle dar. In der Abbildung 10 kann man sehen, dass der erhaltene Lysat sieht viel klarer aus, als die Kontrollprobe. Dies lässt sich dadurch erklären, dass es ein Zerfall der Zellen durch Schädigung der äußeren Zellmembran durch Phagen geschehen ist. Mit anderen Worten ist ein Lysisvorgang passiert.



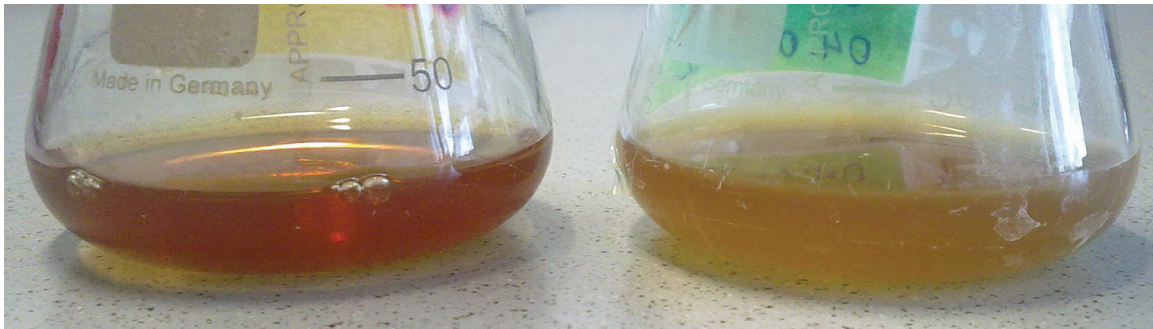


Abbildung 10: Vergleich der Klarheit des Phagenlysats (links) und der Kontrolle (rechts)

Der Versuch besaß zwei Ziele: Züchtung und Vermehrung der T4 Phagen und möglichst effektive Aufbewahrung von denen. Laut der Tabelle 5 kann man schlussfolgern, dass das erste Ziel erreicht wurde.

Die Aufbewahrung der Phagen erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  innerhalb zwei Wochen und nach der Bestimmung des Phagentiters stellte es sich heraus, dass die Anzahl der Phagen um drei Zehnerpotenzen abgenommen hat. Dabei könnte man vermuten, dass das Glycerin keinen guten Schutz gegen Beschädigung der Phagen während des Einfrierens bietet. Als Lösung kann man probieren, statt Glycerin Sucrose zu verwenden. In den Abbildungen 11 und 12 ist ebenfalls zu sehen, dass die Phagenkonzentration bzw. -Anzahl nach dem Gefrieren sich verringert hat.

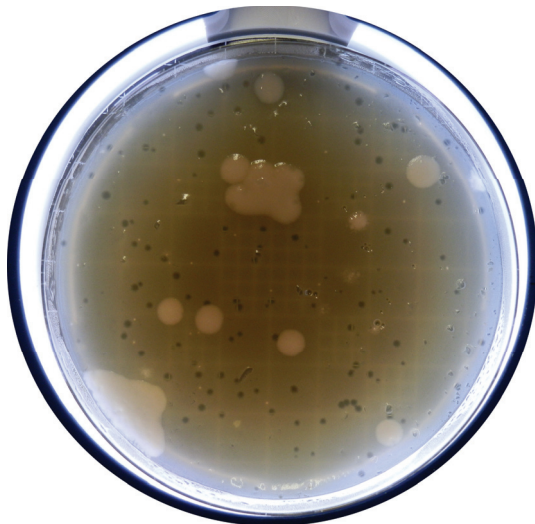


Abbildung 11: Phagenkonzentration im Probenlysats (Phagentiter 2).  
Verdünnungsfaktor:  $10^9$

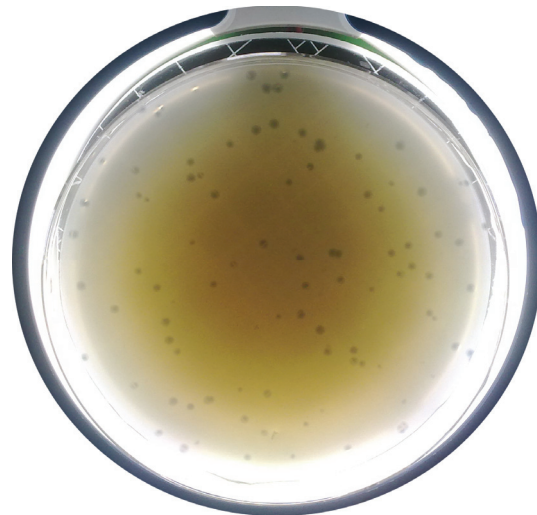


Abbildung 12: Phagenkonzentration im Probenlysats (Phagentiter 3).  
Verdünnungsfaktor:  $10^5$

Parallel mit dem Gefrieren hat man den mit dem Phagenpuffer gemischten Lysat nach erster Zentrifugierung bei  $4^{\circ}\text{C}$  innerhalb von 2 Wochen eingelagert. Dies wurde gemacht, um zwei Methoden des Aufbewahrens von Phagen zu vergleichen und eventuell eine bessere Methode

auszuwählen. Tabelle 6 veranschaulicht die Anzahl und Konzentration der Phagen nach dem Aufbewahren bei 4°C im Vergleich mit den Werten nach 1. Zentrifugierung.

Tabelle 6: Anzahl und Konzentration der Phagen nach dem Aufbewahren bei 4°C

	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Konzentration der Phagen (PbE/ml)</b>	<b>Anzahl der Phagen (PbE)</b>
Aufbewahrung bei 4°C nach 1. Zentrifugierung (Phagentiter 4)	25	$5,3 \cdot 10^{10}$	$1,3 \cdot 10^{12}$
1. Zentrifugierung (Phagentiter 1)	25	$6,05 \cdot 10^{10}$	$1,5 \cdot 10^{12}$

In der Tabelle 6 ist zu sehen, dass nach zwei Wochen sowohl die Konzentration als auch die Anzahl der Phagen sich geringfügig geändert hat. Aus diesem Grund kann man annehmen, dass unter gegebenen Umständen diese Methode im Vergleich mit dem Einfrieren sich besser für die Aufbewahrung der Phagen eignet. Als Vorschlag für die Verbesserung der Methoden der Aufbewahrung von Phagen ist ein Versuch im Abschnitt 4.3 veranschaulicht.

Nicht der letzte Aspekt der Untersuchung ist die Bestimmung von Multiplicity of Infection. Multiplicity of Infection ist oft benutzter Begriff in der Virologie, der die Anzahl von den während der Infizierung hinzugefügten Virionen pro eine Zelle bezeichnet. Für die Berechnung von MOI wird die Anzahl der Viren bzw. Bakteriophagen durch die Anzahl der Bakterienzellen geteilt. Falls, zum Beispiel, ein Million der Virionen zu einem Million Bakterienzellen dazugegeben war, so ist das Multiplicity of Infection gleich eins. Wenn 10 Millionen von Virionen hinzugefügt waren, dann ist MOI gleich zehn. Wird 100 000 von Virionen zugegeben und MOI wird gleich 0,1 und so weiter. Aber es ist erforderlich zu ergänzen, dass falls MOI gleich eins ist, dann bedeutet das nicht, dass jede Zelle der Kultur durch einen Virion infiziert wird. Um zu erfahren, wie viele Virionen bei verschiedenen MOI jede Zelle erreichen, soll man die Poisson-Verteilung benutzen (Formel 1).

$$P(k) = \frac{e^{-m} \cdot m^k}{k!}, \quad (1)$$



wo  $P(k)$  – Anteil der Zellen, die durch  $k$  Partikeln infiziert werden, und  $m$  - Multiplicity of Infection.

Diese Gleichung kann vereinfacht werden, um die Anteil der uninfizierten Zellen ( $k = 0$ , Formel 2), der nur von einem Virion infizierten Zellen ( $k = 1$ , Formel 3) und der von mehreren Virionen infizierten Zellen ( $k > 1$ , Formel 4) zu bestimmen (Racaniello, 2011):

$$P(0) = e^{-m} \quad (2)$$

$$P(1) = m \cdot e^{-m} \quad (3)$$

$$P(>1) = 1 - e^{-m} \cdot (m+1)^1 \quad (4)$$

Hierdurch für die Bestimmung von Multiplicity of Infection des bei 4°C aufbewahrten Lysats soll man folgende Berechnungen durchführen.

Anzahl von plaquebildenden Einheiten pro ml in dem Phagenlysats nach der 1. Zentrifugierung und dem Aufbewahren bei 4°C innerhalb von zwei Wochen ist gleich  $1,3 \cdot 10^{12}$  und Anzahl der koloniebildende Einheiten in einem Milliliter in der Vorkultur vor der unmittelbaren Zugabe des Phagenlysats ist gleich  $1,63 \cdot 10^8$ . Es wird angenommen, dass 50 µl des Phagenlysats zu 23 ml Vorkultur zugegeben wird. Demgemäß kann man den Wert von Multiplicity of Infection folgenderweise berechnen:

$$MOI = \frac{1,3 \cdot 10^{12} \text{ PbE/ml} \cdot 0,05 \text{ ml}}{1,63 \cdot 10^8 \text{ KbE/ml} \cdot 23 \text{ ml}} = \frac{6,5 \cdot 10^{10} \text{ PbE}}{3,7 \cdot 10^9 \text{ KbE}} = 17,5 = 1,75 \cdot 10$$

Nun könnte man berechnen, wie viele Zellen werden von 0, 1 oder mehrere Phagen betroffen sein.

$$P(0) = e^{-m} = 2,72^{-17,5} = 2,5 \cdot 10^{-8}$$

Somit in der Bakterienkultur mit einem Milliarde ( $10^9$ ) von Zellen werden 25 von denen uninfiziert bleiben.

Bei gleichem MOI die Anzahl der Zellen, die 1 Bakteriophage bekommen, ist gleich:

$$P(1) = m \cdot e^{-m} = 17,5 \cdot 2,72^{-17,5} = 4,34 \cdot 10^{-7}$$

---

<sup>1</sup> dieser Wert wurde mittels Subtrahieren von 1 (die Summe aller Wahrscheinlichkeiten für beliebige  $k$ ) der Wahrscheinlichkeit  $P(0)$  und  $P(1)$  bekommen.

In der Bakterienkultur mit einem Milliarde von Zellen werden 434 Zellen durch einen Bakteriophagen infiziert.

Wie viele Zellen bekommen mehr als ein Bakteriophage wird in folgender Berechnung dargestellt:

$$P(>1) = 1 - e^{-m} \cdot (m + 1) = 1 - 2,72^{-17,5} \cdot (17,5 + 1) = 0,999999$$

In der Bakterienkultur mit einem Milliarde von Zellen werden  $9,9 \cdot 10^8$  Zellen mehr als ein Bakteriophage bekommen.

Somit lässt sich folgern, dass mit oben berechneten MOI, im Vergleich mit vorher durchgeführten Versuchen, kann man eine gute Vermehrungsrate von Phagen gewährleisten. Unter Bedingungen, dass 50 µl des Lysats bei der optischen Dichte von 0,3 zur 23 ml der Originalkultur eingegeben werden.

#### 4.2 Behandlung des Hähnchenbrustfilets mit der *Escherichia coli* K12

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Suche der Antwort auf die Frage „Ob es möglich ist, mittels Bakteriophagen die Haltbarkeit der Lebensmitteln zu verlängern?“. Als vorläufiger Arbeit wurde der im Abschnitt 3.3 beschriebene Versuch durchgeführt. Grundidee des Experiments besteht in künstlicher Kontamination des Hähnchenbrustfilets durch Kolonien der *Escherichia coli* K12. Aufgabe der Untersuchung war die Bestimmung der Kolonieanzahl von Bakterien der *Escherichia coli* K12, die an der Oberfläche des Filets angehaftet geblieben waren. Für die Vergleichung wurden zwei Proben genommen und in einen von denen hat man zusätzlich die Bakterienkultur *Escherichia coli* eingebracht.

Die folgende Tabelle (Tabelle 7) veranschaulicht die allgemeine Gesamtkeimzahl (GKZ 1) der Originalkultur nach einer Inkubation bei 37°C und die Gesamtkeimzahl nach der Verdünnung der Originalkultur (GKZ 2) durch die Zugabe in 500 ml NaCl-Lösung. Die durchgeführte Verdünnung sollte der Auswirkung von Phagen begünstigen.

Tabelle 7: Gesamtkeimzahl der Vorkultur vor und nach der Verdünnung

	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$	<b>Gewichteter Mittelwert</b>
GKZ 1	n.a.	n.a.	n.a.	414	106	10	$4,8 \cdot 10^9$ KbE/ml
GKZ 2	55	21	2	n.a.	n.a.	n.a.	$7,03 \cdot 10^5$ KbE/ml

Um die Gesamtkeimzahl der Kontrolle und Probe zu bestimmen, hat man jeder gewogener Filetstück mit 9 Teilen NaCl-Lösung homogenisiert und diese als Verdünnungsstufe  $10^1$  für die weiteren Bestimmungen verwendet. Als man die Gesamtkeimzahl von jedem Stück bestimmt hat, sind folgende Werte (Tabelle 8) rausgekommen. In den Spalten sind die Keimzahlen des jeweiligen Stückes angegeben. In Anlagen B und C sind ebenso die ausführlicheren Daten dargestellt.

Tabelle 8: Durchschnittliche Gesamtkeimzahl der Probe I und II

	1	2	3	4	5
GKZ der Probe I (Kontrolle), KbE/ml	$2,4 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^5$	n.a.	$2,7 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^5$
GKZ der Probe II (+ <i>E.coli</i> K12), KbE/ml	$1,3 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$6,9 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$

Somit ergibt die durchschnittliche Gesamtkeimzahl der Probe I (Kontrolle) ein Wert von  **$8,2 \cdot 10^5$  KbE/ml** und der Probe II (+ *E.coli* K12) ein Wert von  **$2,9 \cdot 10^5$  KbE/ml**. Die Werte unterscheiden sich nur wenig voneinander. Daraus lässt sich beschließen, dass während des Experiments die Keime von *Escherichia coli* an der Oberfläche des Filets nicht geblieben sind. Deswegen kann man probieren, die Konzentration der Vorkultur in Probe II zu erhöhen. Bei der Untersuchung der Agarplatten neben den Keimen von *Escherichia coli* wurden auch die Keime anderer unbekannter Bakterien festgestellt. Um dies zu vermeiden, könnte man die Stücke des Filets vor dem Experiment gründlich waschen. Als Empfehlung für die Verbesserung und Erweiterung dieses Experiments ist ein Versuch im Abschnitt 4.3 dargestellt.

### 4.3 Ausblicke der weiteren Experimente

In diesem Abschnitt sind die Empfehlungen und Durchführung für weitere Versuche dargestellt. Um eine bessere Methode für die längere Aufbewahrung der Phagen zu finden, kann man das in der Abbildung 9 dargestellten Experiment durchführen.

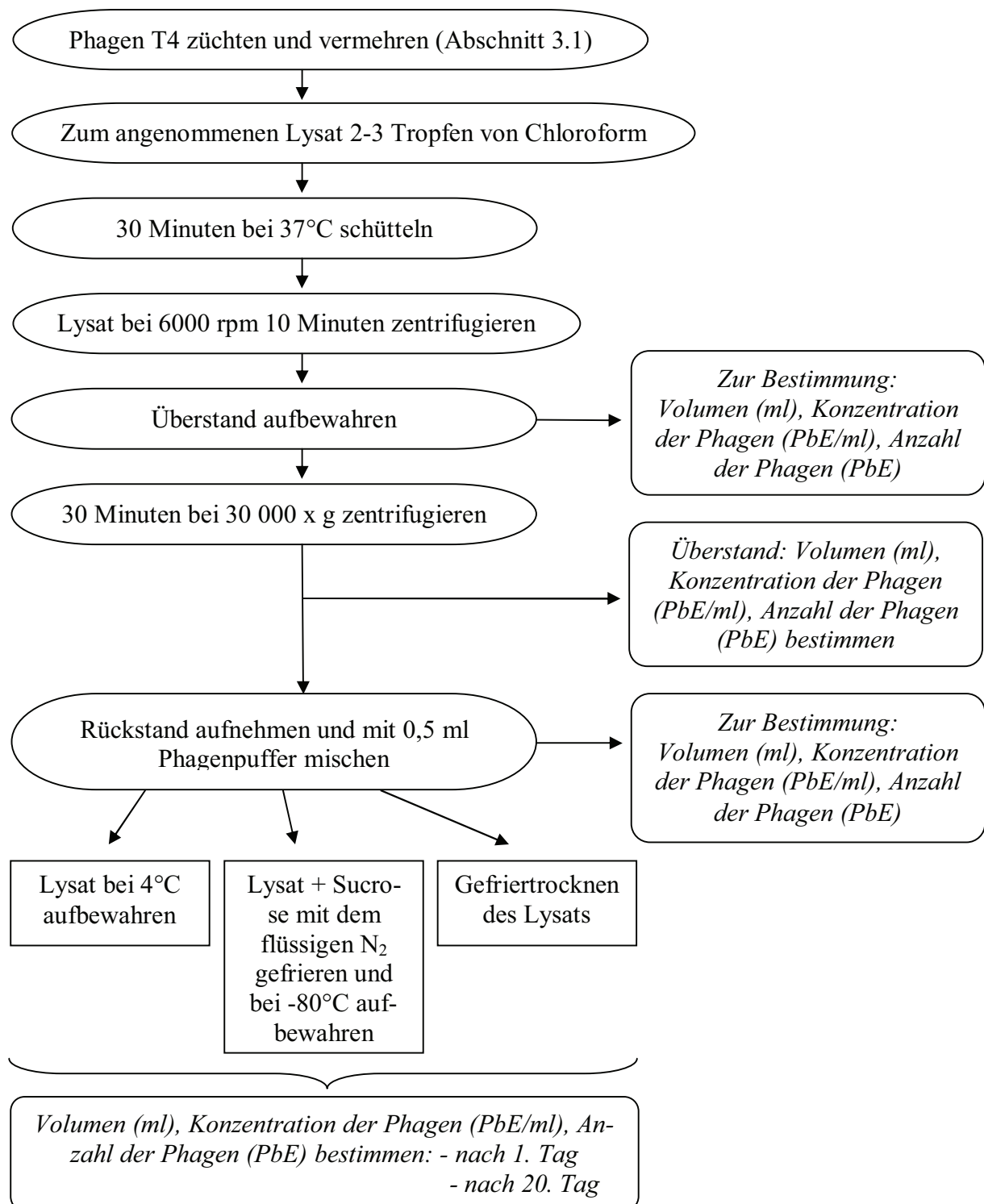


Abbildung 13: Experiment für die Suche der besseren Aufbewahrungsmethode

Im dargestellten Versuch wurde vorgeschlagen, den Phagentiter des Überstands nach zweiter Zentrifugierung zu bestimmen. Dies könnte man machen, um festzustellen, wie viele Phagen bei der zweiten Zentrifugierung verloren gehen und ob es sinnvoll ist, diese durchzuführen. Als die Möglichkeiten der Aufbewahrung wurden drei Methoden vorgelegt:

- den mit dem Phagenpuffer gemischten Lysat bei 4°C lagern
- den Lysat mit der Sucrose mischen, im flüssigen Stickstoff einfrieren und anschließend bei -80°C aufbewahren
- Den Lysat gefriertrocknen, um eine längere Haltbarkeit zu gewährleisten

Bei jedem von den drei Vorgängen soll man nach erstem Tag und jeweils nach dem 20. Tag die Konzentration und Anzahl der Phagen bestimmen. Nachher die erhaltenden Werte werden verglichen und die Methode mit den niedrigsten Absterberate ausgewählt.

Als weiterer Punkt der Untersuchungen kann man die Bearbeitung der Fleischerzeugnisse mit den Phagen darstellen. Das Ziel des unten beschriebenen Versuchs ist die künstliche Kontamination des Geflügel filets durch die Kultur *Escherichia coli* und dessen Behandlung mit den Phagen. Als Probeversuch wurde das Experiment im Abschnitt 3.2 beschrieben. In diesem Versuch hat man die Stücke des Hähnchenbrust filets in die NaCl-Lösung mit *E. coli* eingetaucht und anschließend für jeden Stück die Gesamtkeimzahl bestimmt. Die durchschnittliche Gesamtkeimzahl der Proben wurde mit durchschnittlicher Gesamtkeimzahl der Kontrollproben (ohne *Escherichia coli*) verglichen. Als Ergebnis hat man festgestellt, dass kein wesentlicher Unterschied zwischen Probe und Kontrolle bestand, das heißt, dass fast keine Keime an der Oberfläche des Filets geblieben sind. Woraus lässt sich folgern, dass das Problem wahrscheinlich in der Art und Weise der Kontaminierung liegt. Im folgenden Experiment (Abbildung 10) sind die Verbesserungsvorschläge zur Kontamination und weitere Arbeitsfolge mit den Phagen dargestellt.

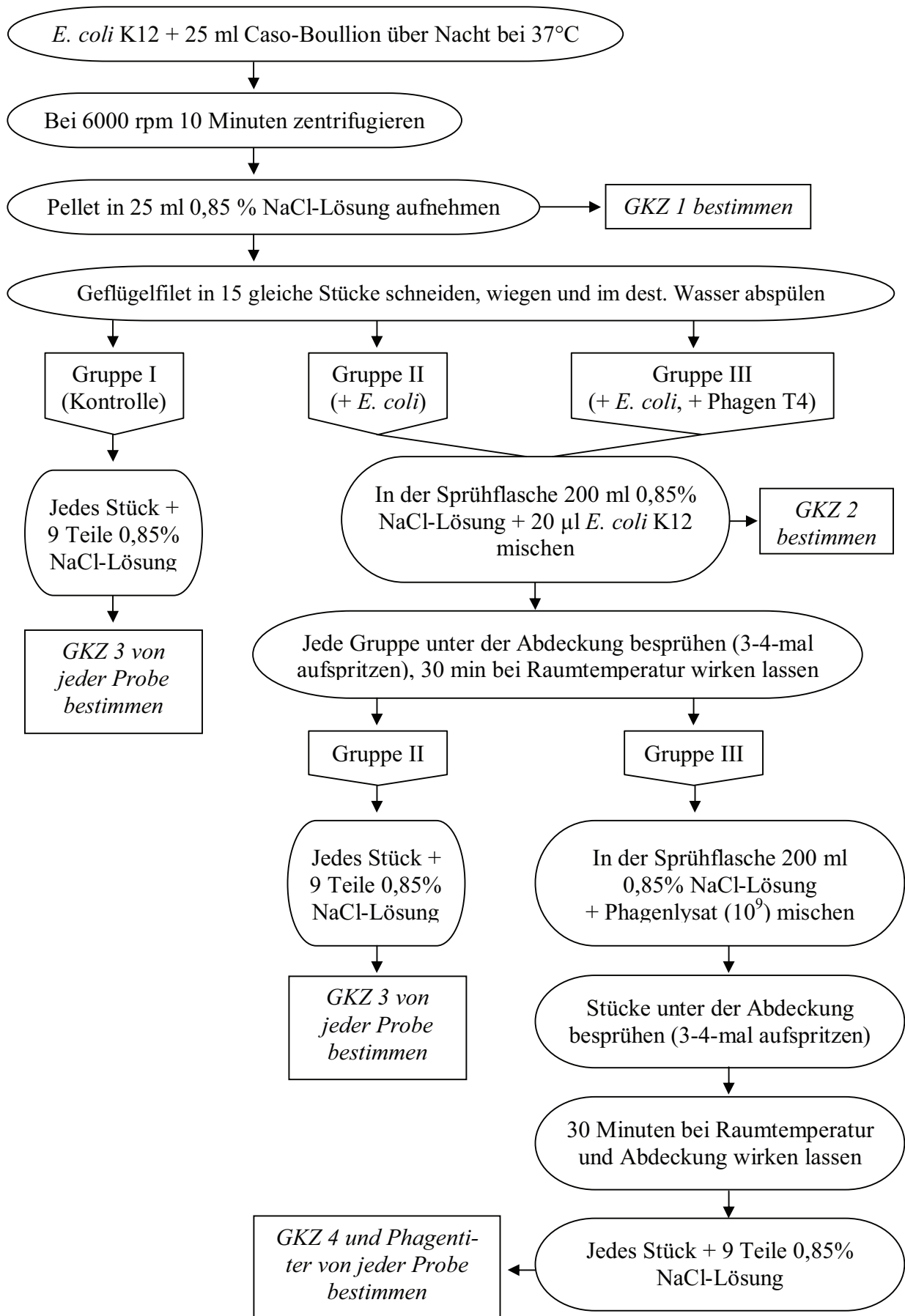


Abbildung 14: Experiment für die Bearbeitung des Geflügel filets mit den Phagen

Als Methode für die Kontaminierung des Filets kann man vorschlagen, die Stücke zuerst gründlich mit destilliertem Wasser zu spülen und danach die mittels Sprühflasche mit Vorkultur *Escherichia coli* K12 zu besprühen. Die Vorkultur soll zuerst verdünnt sein, um eine bessere Wirkung der Phagen zu gewährleisten. Beim Sprühvorgang sollte man bestimmte Anzahl des Aufspritzens durchführen, um nachher das gesamte Volumen der zugebrachten Vorkultur zu bestimmen. Bei diesem Experiment teilt man die Filetstücke in drei Gruppen. Erste Gruppe wird als Kontrolle behandelt. Zweite Gruppe soll zeigen, wie viele Bakterien an der Oberfläche des Filets nach der Kontamination bleiben. Dritte Gruppe wird zuerst mit der Kultur kontaminiert und danach mit den Phagen behandelt. Von jeder Gruppe soll die Gesamtkeimzahl und nach der Behandlung mit den Phagen der Phagentiter bestimmt werden. Dafür wird jedes am Anfang abgewogenes Filetstück in 9 Teilen 85%-igen NaCl-Lösung homogenisiert und dies wird als Verdünnungsstufe  $10^1$  betrachtet.

Mit diesem Experiment kann man die Frage beantworten, ob mittels der Bakteriophagen die Oberflächenkontaminierung des Geflügelfilets beseitigt werden kann. Als Ergebnis bei dem erfolgreichen Versuch ist es zu erwarten, dass die Gesamtkeimzahl nach der Behandlung mit den Phagen niedriger wird, als die Gesamtkeimzahl vor der Behandlung.

Das vorgelegte Experiment soll als ein Modelversuch angesehen werden, wobei die Wirkung bestimmtes Bakteriophagen (T4) auf bestimmten Wirtsbakterien (*Escherichia coli*) untersucht wird. Da an der Oberfläche des beliebigen Lebensmittels, unter anderem des Geflügelfilets, verschiedene Arten von Keimen auftreten, ist es davon auszugehen, dass man im industriellen Maßstab bestimmte unspezifische Phagen oder Phagengemische verwenden soll. Dabei auch ist wichtig zu berücksichtigen, dass man für die industrielle Verwendung größere Mengen an Bakteriophagen benötigt. Dafür soll man die Methoden für die Haltbarmachung und Aufbewahrung der Phagen optimieren, um eine möglichst langfristige und effektive Lagerung zu gewährleisten. Die wichtige Frage bei der Anwendung der Phagen ist die Temperatur der Behandlung. In vielen Literaturquellen wurde besprochen, dass die Vermehrung von Phagen und anschließende Reduzierung der pathogenen Keime auch bei niedrigen Temperaturen erfolgreich sein kann. Dies ist sehr günstig bei der Anwendung der Phagen zur biologischen Kontrolle der Lebensmittel während der industriellen Herstellung. Hierdurch kann man für die weiteren Experimente vorschlagen, die Temperatur und Zeit bei der Behandlung mit den Phagen zu variieren.

## 5 Zusammenfassung

Das Hauptziel der dargestellten Arbeit war die Untersuchung von Effektivität der Anwendung der Bakteriophagen bei der Bekämpfung gegen pathogene Bakterien in Lebensmittel. Ebenso wurde versucht, die Bakteriophagen zu vermehren und anschließend möglichst lang aufzubewahren. Zu diesem Zweck wurden Experimente zur Vermehrung des Phagen T4 auf den Wirtsbakterien *Escherichia coli* durchgeführt. Dabei wurde eine gute Vermehrung der Phagen festgestellt. Für die Prüfung der Haltbarkeit der Bakteriophagen wurden 2 Proben bei 4°C bzw. bei -80°C 2 Wochen lang aufbewahrt. Nach der Phagentiterbestimmung hat man festgestellt, dass die Phagen in dem eingefrorenen Lysat teilweise abgestorben waren, während in der zweite Probe keine bedeutsame Änderung der Anzahl von Phagen nachgewiesen wurde. Hierdurch wurden die Ausblicke für die weiteren Experimente vorgeschlagen und zwar für die Optimierung der Methoden von Phagenaufbewahrung und für die Behandlung des Geflügel filets mit den Phagen.

Bakteriophagen sind schon seit langem bekannt. Die spezifischen Eigenschaften der Phagen bestimmte Bakterienarten zu infizieren, bieten viele Möglichkeiten zu deren Untersuchung. Anhand der verfügbaren Studien werden die Bakteriophagen als Alternative zur Antibiotika bei der Bekämpfung mit pathogenen Keimen dargestellt. Die Untersuchung der Bakteriophagen als Biokontroller wurde vor ungefähr 20 Jahren angefangen und entwickelt sich bis auf den heutigen Tag.

Zusammenfassend alle untersuchten Materialien kann man folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Bakteriophagen können virulent oder temperent sein. Aufgrund der Infektion die erste Gruppe tötet ihre Wirtsbakterien so, dass nur die für die Dekontamination der Lebensmittel gewählt werden. Temperente Bakteriophagen töten ihre Wirtszellen nicht und können denen verschiedene Eigenschaften zuteilen.
- Bakteriophagen können die Lysis der Wirtszelle durch sogenannten „lysis from within“ (von innen) und „lysis from without“ (von außen) aufrufen.
- Bakteriophagen haben einen engen Bereich der Wirtsbakterien, die allgemein durch eine begrenzte Anzahl der Arten innerhalb einer Gattung oder der Stämme innerhalb einer Art eingeschränkt sind.



- Bakteriophagen vermehren sich am besten in den wachsenden Zellen, jedoch haben die Studien gezeigt, dass sie sich auch bei der stationären Phase der Zellen vermehren können.
- Das Verhältnis der Bakteriophagen zu den Wirtszellen ist für die erfolgreiche Behandlung mit den Phagen ausschlaggebend. Je höher ist dieses Verhältnis, desto effektiver die Reduzierung der Wirtsbakterien ist.
- Die Bakteriophagen kommen in verschiedenen Orten vor und können deshalb aus dem Fleisch, der Milch und deren Erzeugnissen isoliert werden.
- Die gegen Bakteriophagen resistenten Bakterien können sich zwischen den Wirtsbakterien befinden. Die Häufigkeit des Entstehens solcher Mutationen und ihrer Folgen kann von dem Bakteriophagen, den Bedingungen seiner Anwendung und der Wirtsbakterium abhängig sein.

Antwortend auf die Frage, ob die mikrobiologische Sicherheit von Lebensmitteln mit Hilfe von Bakteriophagen verbessert werden kann, kann man sagen, dass schon vieles dafür gemacht wurde. Es gibt zahlreiche Untersuchungen mit verschiedenen Lebensmitteln, nicht nur tierischer Herkunft, und erfolgreiche Ergebnisse bei der Behandlung deren mit den Phagen. Jedoch bleibt noch vieles in diesem Bereich unbekannt, was zu den neuen Untersuchungen beiträgt.

## 6 Literaturverzeichnis

Andreoletti, O.; Budka, H.; Buncic, S.; Colin, P.; Collins, J. D.; De Koeijer, A.; Griffin, J.; Havelaar, A.; Hope, J.; Klein, G.; Kruse, H.; Magnino, S.; López, A. M.; McLauchlin, J.; Nguyen-The, Ch.; Noeckler, K.; Noerrung, B.; Maradona, M. P.; Roberts, T.; Vågsholm, I.; Vanopdenbosch, E.: The use and mode of action of bacteriophages in food production. The EFSA Journal (2009), Nr. 1076, S. 1-26

Atterbury, R. J.; Connerton, P. L.; Dodd, Ch. E. R.; Rees, C. E. D.; Connerton I. F.: Application of Host-Specific Bacteriophages to the Surface of Chicken Skin Leads to a Reduction in Recovery of *Campylobacter jejuni*. Applied and Environmental Microbiology (2003), Nr. 69, S. 6302–6306

BfR: Entwicklung von Handlungsoptionen zur Reduzierung von *Campylobacter* spp. im Geflügelbereich. Kurzprotokoll eines Sachverständigengesprächs im BfR (2006), S. 1-8

Bielke, L. R.; Higgins, S. E.; Donoghue A. M.; Donoghue D. J.; Hargis B. M.; Tellez, G.: Use of Wide-Host-Range Bacteriophages to Reduce *Salmonella* on Poultry Products. International Journal of Poultry Science (2007), Nr. 10, S. 754-757

Bigwood, T.; Hudson, J. A.; Billington, C.; Carey-Smith, G. V.; Heinemann, J. A.: Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. Food Microbiology (2008), Nr. 25, S. 400-406

Böhland, C.: Erfahrungen zum Einsatz verschiedener *E. coli*-Inaktivatvakzine bei Legehennen im alternativen Haltungssystem unter Feldbedingungen. Fachbereich Veterinärmedizin. Freie Universität Berlin, 2007

Bradley, D. E.: The Structure of the Head, Collar and Base-Plate of 'T-even' Type Bacteriophages. Journal of General Microbiology (1965), Nr. 38, S. 395-408

Brüssow, H.: Phagen als Alternative zu Antibiotika?. BIOSpektrum (2009), Nr. 4, S. 459  
Cairns, J.; Stent, G. S.; Watson, J. D.; Geissler, E.: Phagen und die Entwicklung der Molekularbiologie. Berlin: Akademie, 1972

Cypionka, H.: Grundlagen der Mikrobiologie. 2. Auflage. Berlin: Springer, 2003

Depping, R.: Charakterisierung der ADP-Ribosyltransferasen ModA, ModB und Alt des Bakteriophagen T4. Fakultät für Biologie, Ruhr-Universität Bochum, 2001

Fehlhaber, K.; Kleer, J.; Kley, F.: Handbuch Lebensmittelhygiene. Hamburg: Behr, 2005

Goode, D.; Allen V. M.; Barrow P. A.: Reduction of Experimental Salmonella and *Campylobacter* Contamination of Chicken Skin by Application of Lytic Bacteriophages. Applied and Environmental Microbiology (2003), Nr. 69, S. 5032-5036

Goodridge, L. D.; Bisha, B.: Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. Bacteriophage (2011), Nr. 1, S. 130-137

Graw, J.; Henning, W.: Genetik. 5. Auflage. Berlin: Springer, 2010

Greer, G. G.: Effects of Phage Concentration, Bacterial Density, and Temperature on Phage Control of Beef Spoilage. Journal of Food Science (2006), Nr. 53, S. 1226-1227

Greer, G. G.: Psychrotrophic *Brocothrix thermosphacta* Bacteriophages Isolated from Beef. Applied and Environmental Microbiology (1983), Nr. 46, S. 245-251

Hagens, S.; Loessner M. J.: Bacteriophage for Biocontrol of Foodborne Pathogens: Calculations and Considerations. Current Pharmaceutical Biotechnology (2010), Nr. 11, S. 58-68

Heller, K. J.; Fieseler, L.; Loessner, M. J.: Bakteriophagen: Grundlagen, Rolle in Lebensmitteln und Anwendungen zum Nachweis sowie der Kontrolle von Krankheitserregern. Hamburg: Behr's, 2011

Hensel, L.: Lukopolis Biologie. Bakteriophagen.

<http://www.lukashensel.de/biomain.php?biopage=phagen>. aufgerufen am: 16.01.2012

Kaps, J.: Identifizierung und Anwendungen von Phagenproteinen zum Nachweis von *Listeria* spp. Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, 2010

Krasilnikov, N. A.; Uranov, A.A.: Das Leben der Pflanzen. Band 1. Moskau: Prosveshenie, 1974 (russische Ausgabe)

Mehrke, G.: Merkmale und Eigenschaften biotechnisch bedeutsamer Mikroorganismen. Hochschule Ulm, 2006

Mossel, D. A. A.: Essentials of the microbiology of foods. Chichester: Wiley, 1995

O'Flaherty, S.; Ross, R. P.; Meaney, W.; Fitzgerald, G. F.; Elbreki, M. F.; Coffey, A.: Potential of the Polyvalent Anti-*Staphylococcus* Bacteriophage K for Control of Antibiotic-Resistant *Staphylococci* from Hospitals. Applied and Environmental Microbiology (2005), Nr. 71, S. 1836-1842

O'Flynn, G.; Ross, R. P.; Fitzgerald, G. F.; Coffey, A.: Evaluation of a Cocktail of Three Bacteriophages for Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. Applied and Environmental Microbiology (2004), Nr. 70, S. 3417-3424

Racaniello, V.: Multiplicity of infection.

<http://www.virology.ws/2011/01/13/multiplicity-of-infection>. 13.01.2011, aufgerufen am 02.02.2012

Regenass-Klotz, M: Grundzüge der Gentechnik: Theorie und Praxis. 3. Auflage. Basel: Birkhäuser, 2005

Sabour, P. M.; Griffins, M. W.: Bacteriophages in the control of food- and waterborne pathogens. Washington, DC : ASM Press, 2010

Sinell, H. J.: Einführung in die Lebensmittelhygiene. 4. Auflage. Stuttgart: Parey, 2004

Süßmuth, R.; Eberspracher, J.; Haag R.; Springer W.: Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum. Stuttgart: Thieme, 1999

Wagenaar, J. A.; Van Bergen, M. A. P; Mueller, M. A.; Wassenaar, T. M.; Carlton, R. M.: Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Veterinary Microbiology* (2005), Nr. 109, S. 275-283

Wiggins B. A.; Alexander, M.: Minimum Bacterial Density for Bacteriophage Replication: Implications for Significance of Bacteriophages in Natural Ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* (1985), Nr. 49, S. 19-23

Zickrick, K.; Wegner, K.; Schreiter, M.; Schiefer, G.; Saupe, Ch.; Münch, H. D.: *Mikrobiologie tierischer Lebensmittel*. 2. Auflage. Thun: Deutsch, 1987

## 7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Darstellung der Morphologietypen von Bakteriophagen .....	8
Abbildung 2: Aufbau des T-Phagen .....	9
Abbildung 3: Vermehrung von Phagen nach lytischer und lysogener Zyklus .....	10
Abbildung 4: T4-Phagen greifen einen <i>Escherichia coli</i> Zelle an .....	13
Abbildung 5: Wachstumskurve von <i>Escherichia coli</i> K12 .....	27
Abbildung 6: Gesamtkeimzahl der <i>Escherichia coli</i> K12 beim Null-Punkt. Verdünnungsfaktor: $10^5$ .....	28
Abbildung 7: Gesamtkeimzahl der <i>Escherichia coli</i> K12 bei $OD \approx 0,3$ . Verdünnungsfaktor: $10^5$ .....	28
Abbildung 8: Phagenkonzentration im Originallysate. Verdünnungsfaktor: $10^7$ .....	30
Abbildung 9: Phagenkonzentration im Probenlysate (Phagentiter 1). Verdünnungsfaktor: $10^7$ .....	30
Abbildung 10: Vergleich der Klarheit des Phagenlysates (links) und der Kontrolle (rechts) .....	31
Abbildung 11: Phagenkonzentration im Probenlysate (Phagentiter 2). Verdünnungsfaktor: $10^9$ .....	31
Abbildung 12: Phagenkonzentration im Probenlysate (Phagentiter 3). Verdünnungsfaktor: $10^5$ .....	31
Abbildung 13: Experiment für die Suche der besseren Aufbewahrungsmethode .....	36
Abbildung 14: Experiment für die Bearbeitung des Geflügel filets mit den Phagen .....	38

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bakterielle und pilzliche Mikroorganismen, die beim Geflügel vorkommen.....	16
Tabelle 2: Gesamtkeimzahl am Anfang des Experiments und vor der Eingabe des Phagenlysats für die Züchtung der T4 Phagen .....	27
Tabelle 3: Anzahl der Plaque bildenden Einheiten pro Milliliter im Originallysate und im Probenlysate nach der Züchtung von T4 Phagen. ....	28
Tabelle 4: Phagentiter 2 und Phagentiter 3 des Probenlysats .....	29
Tabelle 5: Anzahl der Phagen nach dem Versuch der Züchtung von T4 Phagen.....	29
Tabelle 6: Anzahl und Konzentration der Phagen nach dem Aufbewahren bei 4°C .....	32
Tabelle 7: Gesamtkeimzahl der Vorkultur vor und nach der Verdünnung .....	34
Tabelle 8: Durchschnittliche Gesamtkeimzahl der Probe I und II.....	35



## 9 Anlage

### Anlage A: Während des Experiments gemessene optische Dichte

Zeit (min)	Optische Dichte (Kontrolle)	Optische Dichte (Originallysate, 50 µl)
0	0,108	0,112
30	0,146	0,119
60	0,175	0,175
90	0,313	0,316
120	0,482	0,432
150	0,715	0,532
180	0,907	0,504
210	1,062	0,414
240	1,264	0,247
270	1,22	0,129

### Anlage B: Durchschnittliche Gesamtkeimzahl der Probe I (Kontrolle)

	1	2	3	4	5
$10^4$	3	21	n.a.	n.a.	3
$10^5$	18	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
$10^6$	n.a.	n.a.	n.a.	1	n.a.
$10^7$	5	n.a.	n.a.	1	n.a.
$10^8$	n.a.	n.a.	n.a.	1	9
Gewichteter Mittelwert, Kbe/ml	$2,4 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^5$	n.a.	$2,7 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^5$

**Anlage C: Durchschnittliche Gesamtkeimzahl der Probe II (+ *E.coli* K12)**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
$10^4$	1	34	6	38	n.a.
$10^5$	4	n.a.	n.a.	n.a.	1
$10^6$	5	3	6	19	n.a.
$10^7$	1	n.a.	6	1	n.a.
$10^8$	3	n.a.	n.a.	12	n.a.
Gewichteter Mittelwert, KbE/ml	$1,3 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$6,9 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$

## **Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Studienarbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift