

Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Behandlung von *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen  
mithilfe von Bakteriophagen**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Jana Elisabeth Lea Perleth**  
Tierärztin aus München

Berlin 2022  
Journal-Nr.: 4347







Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Behandlung von *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen mithilfe von Bakteriophagen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Jana Elisabeth Lea Perleth  
Tierärztin  
aus München

**Berlin 2022**  
**Journal-Nr.: 4347**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Tassilo Seidler  
Dritter Gutachter: PD Dr. Felix Reich

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

pseudomonas aeruginosa; biofilms; bacteriophages; surfaces; food hygiene; food safety;  
public health

Tag der Promotion: 17.05.2022

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-165-0

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2022**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2022 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin  
verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	V
1. Einleitung.....	1
2. Literatur .....	2
2.1. Biofilme .....	2
2.1.1. Definition und Entstehung .....	2
2.1.2. Vorkommen und Bedeutung .....	4
2.1.3. Möglichkeiten der Bekämpfung.....	4
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
2.2.1. Charakteristika .....	6
2.2.2. Vorkommen und Bedeutung .....	8
2.3. Bakteriophagen.....	9
2.3.1. Charakteristika .....	9
2.3.2. Lebenszyklus und Lyseformen.....	12
2.3.3. Resistenzentwicklung von Bakterien gegen Phagen sowie Koevolution .....	14
2.3.4. Einsatz im Klinik- und Lebensmittelbereich.....	17
3. Material und Methoden.....	19
3.1. Material.....	19
3.1.1. Nährmedien.....	19
3.1.2. Chemikalien .....	19
3.1.3. Bakterienstämme .....	19
3.1.4. Bakteriophagen .....	20
3.1.5. Geräte und Software .....	21
3.1.6. Verbrauchsmaterialien .....	21
3.2. Methoden.....	22
3.2.1. Herstellung des Softagars.....	22
3.2.2. Übernachtkultur und Flüssigkultur.....	22
3.2.3. Tropfplattenverfahren.....	22
3.2.4. Phagenvermehrung.....	22
3.2.5. Plaque Assay zur Ermittlung des Phagentiters .....	23
3.2.6. Spot Assay zur Ermittlung des Wirtsspektrums .....	23
3.2.7. Zellzahlreduktion durch Bakteriophagen.....	23
3.2.8. Prävention eines Biofilms.....	24

3.2.9. Bekämpfung eines etablierten Biofilms .....	24
3.2.10. Genomsequenzierung und Bioinformatische Auswertung .....	25
3.2.11. Statistik.....	26
4. Ergebnisse .....	27
4.1. Wirtsspektrum.....	27
4.2. Zellzahlreduktion durch Bakteriophagen .....	28
4.2.1. Zellzahl.....	28
4.2.2. Phagentiter.....	35
4.3. Prävention eines Biofilms .....	40
4.3.1. Biofilm Assay.....	40
4.3.2. Resistente Klone nach Inkubation.....	42
4.4. Bekämpfung eines Biofilms .....	43
4.4.1. Biofilm Assay.....	43
4.4.2. Resistente Klone nach Inkubation.....	48
4.5. Genomsequenzierung und Bioinformatische Auswertung.....	50
5. Diskussion .....	53
5.1. Wirtsspektrum.....	53
5.2. Zellzahlreduktion durch Bakteriophagen .....	53
5.3. Prävention eines Biofilms .....	58
5.4. Bekämpfung eines Biofilms .....	60
5.5. Genomsequenzierung und Bioinformatische Auswertung.....	64
6. Zusammenfassung.....	67
7. Summary.....	69
8. Literaturverzeichnis .....	71
Anhang .....	VII
Publikationen.....	X
Danksagung .....	XI
Interessenskonflikte - Conflict of Interest .....	XII
Selbstständigkeitserklärung .....	XIII



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biofilmentstehung, modifiziert nach Sauer .....	3
Abbildung 2: Stammbaum Bakteriophagen nach ICTV .....	10
Abbildung 3: Aufbau der Caudovirales, modifiziert nach Nobrega et al. ....	11
Abbildung 4: Einteilung von Bakteriophagen, modifiziert nach Thung et al. ....	12
Abbildung 5: Zyklen der Phagenvermehrung, modifiziert nach Pyzik et al. ....	14
Abbildung 6: Zellzahlreduktion durch Bakteriophagen bei 37 °C .....	33
Abbildung 7: Zellzahlreduktion durch Bakteriophagen bei 12 °C .....	34
Abbildung 8: Phagentiter bei 37 °C .....	36
Abbildung 9: Phagentiter bei 12 °C .....	37
Abbildung 10: Prävention eines Biofilms bei 37 °C .....	41
Abbildung 11: Prävention eines Biofilms bei 12 °C .....	41
Abbildung 12: Eliminierung eines etablierten Biofilms nach 6 h bei 37 °C .....	46
Abbildung 13: Eliminierung eines etablierten Biofilms nach 24 h bei 37 °C .....	46
Abbildung 14: Eliminierung eines etablierten Biofilms nach 24 h bei 12 °C .....	47
Abbildung 15: Eliminierung eines etablierten Biofilms nach 72 h bei 12 °C .....	47
Abbildung 16: Prävention eines Biofilms .....	59
Abbildung 17: Eliminierung eines Biofilms bei 37 °C .....	61
Abbildung 18: Eliminierung eines Biofilms bei 12 °C .....	62

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nährmedien .....	19
Tabelle 2: Chemikalien .....	19
Tabelle 3: Eingesetzte Bakterienstämme .....	20
Tabelle 4: Geräte .....	21
Tabelle 5: Software .....	21
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien .....	21
Tabelle 7: Spot Assays zur Bestimmung des Wirtsspektrums der Wildstämme .....	28
Tabelle 8: Spot Assays zur Feststellung einer Resistenzentwicklung nach Inkubation mit vB_Pae-TbilisiM32 .....	39
Tabelle 9: Spot Assays zur Feststellung einer Resistenzentwicklung nach Inkubation mit vB_Pae-CS2310 .....	39
Tabelle 10: Spot Assays zur Feststellung einer Resistenzentwicklung nach Inkubation zur Biofilmprävention .....	43
Tabelle 11: Spot Assays zur Feststellung einer Resistenzentwicklung nach 6 h Inkubation zur Eliminierung eines Biofilms .....	49
Tabelle 12: Spot Assays zur Feststellung einer Resistenzentwicklung nach 24 h Inkubation zur Eliminierung eines Biofilms .....	50
Tabelle 13: relevante Gene bei Phagenresistenz .....	VII
Tabelle 14: Vorkommen der 44 Gene bei den <i>P. aeruginosa</i> -Wildstämmen .....	IX

# Abkürzungsverzeichnis

Abi-System	engl. <i>abortive infection</i> System
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BHI	engl. <i>Brain Heart Infusion</i>
Cas-Proteine	CRISPR-assoziierte Proteine
CFU	Koloniebildende Einheiten (engl. <i>colony forming units</i> )
CRISPR	engl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dsDNA, ssDNA	Doppelstrang-DNA, Einzelstrang-DNA (engl. <i>single-stranded DNA</i> )
DSM(Z)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen)
eDNA	extrazelluläre DNA
EOP	engl. <i>Efficiency of Plating</i>
EPS	extrazelluläre polymere Substanz
h	Stunde(n) (engl. <i>hours</i> )
ICTV	engl. <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
ILH	Institut für Lebensmittelsicherheit und –hygiene, Freie Universität Berlin
IMT	Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin
ITU	Institut für Tier- und Umwelthygiene, Freie Universität Berlin
Kbp	Kilobasenpaare
Mbp	Megabasenpaare
MHBr	engl. <i>Mueller-Hinton-Broth</i>
ml	Milliliter
OD	optische Dichte
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PC	engl. <i>Plate Count</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PFU	Plauebildende Einheiten (engl. <i>plaque forming units</i> )
PQS	engl. <i>Pseudomonas quinolone signal</i>
QQ	engl. <i>Quorum Quenching</i>
QS	engl. <i>Quorum Sensing</i>
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung (engl. <i>relative centrifugal force</i> )
R / M-System	engl. <i>restriction/ modification</i> -System
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
Sie-System	engl. <i>superinfection exclusion</i> -System
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter



# 1. Einleitung

*Pseudomonas (P.) aeruginosa* sind gram-negative bewegliche Bakterien und stellen in vielen Bereichen ein gesundheitliches Risiko dar. Aufgrund ihrer hohen Anpassungsfähigkeit an ihre Umgebung kommen sie in nahezu allen Habitaten vor, sie bevorzugen jedoch ein feuchtes Klima. Dementsprechend findet man *P. aeruginosa* häufig in Wasserleitungen vor. Dies ist insbesondere in Krankenhäusern von Bedeutung, denn dort sind sie einer der häufigsten Auslöser nosokomialer Infektionen. Neben Komplikationen von bereits bestehenden Infektionen lösen *P. aeruginosa* vor allem Lungenentzündungen, Harnwegs- und Wundinfektionen aus. Eine Übertragung erfolgt häufig über kontaminierte medizinische Geräte und Materialien, auf denen *P. aeruginosa* widerstandsfähige Biofilme ausbilden können.

Die Ausbildung von *P. aeruginosa*-Biofilmen spielt in Betrieben entlang der Lebensmittelkette ebenfalls eine große Rolle. *P. aeruginosa* führen hierbei nicht nur zu einem schnelleren Verderb der Lebensmittel, die Biofilme führen auch zu einer vorzeitigen Materialkorrosion. Zudem dienen *P. aeruginosa*-Biofilme anderen, humanpathogenen Mikroorganismen, wie z.B dem humanpathogenen Bakterium *Campylobacter jejuni*, als Besiedlungsgrundlage, was schwere Lebensmittelinfektionen oder -intoxikationen nach sich ziehen kann.

Die Eliminierung solcher Biofilme gestaltet sich als schwierig, da Biofilme dank ihrer Schutzschicht eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Einflüssen haben. Zudem bilden *P. aeruginosa* Multiresistenzen nicht nur gegen Antibiotika, sondern auch gegen verschiedene Reinigungs- bzw. Desinfektionsmittel aus. Um diese Schutzmechanismen zu überwinden, sind alternative therapeutische Ansätze vonnöten. Besonders interessant sind hierfür Bakteriophagen, die als Cocktail eingesetzt durch die ihnen eigenen Enzyme in der Lage sind, die extrazelluläre polymere Substanz der Biofilme aufzulösen und die Bakterien so effektiv bekämpfen können.

Ziel dieser Arbeit war es daher, einen Phagencocktail aus zwei ausgewählten *P. aeruginosa*-Bakteriophagen, vB\_Pae\_CS2310 und vB\_Pae-TbilisiM32, auf seine Wirksamkeit zur Bekämpfung von Biofilmen zu testen. Der Cocktail wurde auf seine Fähigkeit hin untersucht, einer *P. aeruginosa*-Biofilmbildung vorzubeugen, sowie einen bereits etablierten Biofilm zu bekämpfen. Hierfür wurden sechs gegenüber beiden einzelnen Phagen sensible *P. aeruginosa*-Wildstämme ausgewählt. Zugrundeliegende Mechanismen bei sich möglicherweise entwickelnden Resistenzen der *P. aeruginosa*-Wildstämme gegenüber den Bakteriophagen sollten genauer untersucht werden.

## 2. Literatur

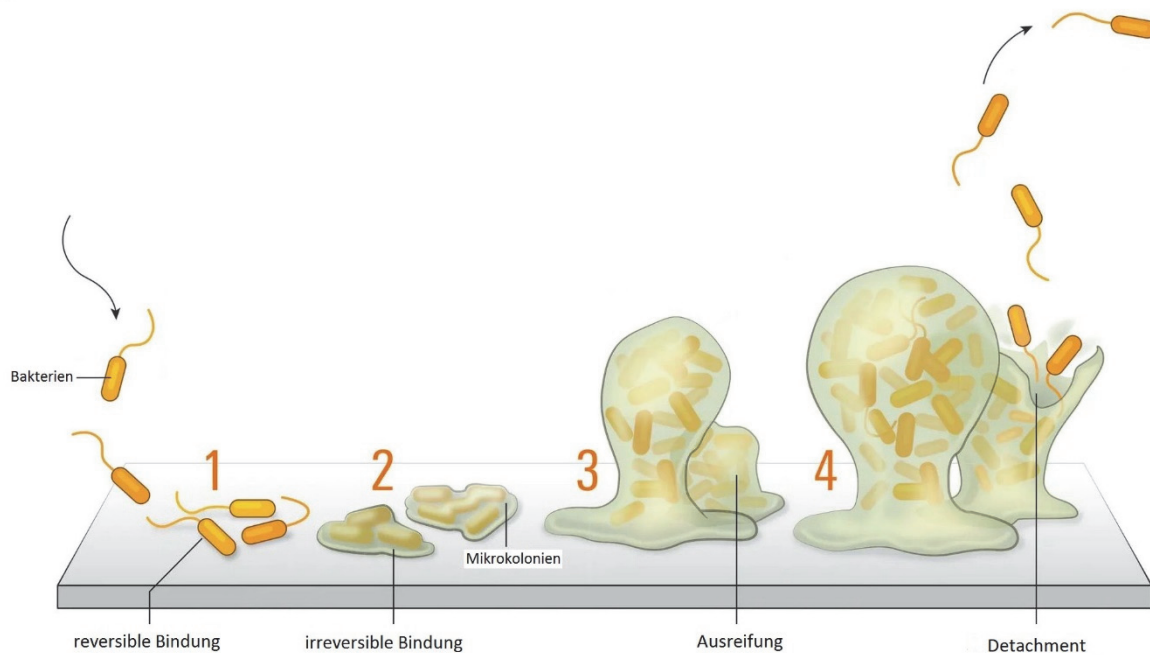
### 2.1. Biofilme

#### 2.1.1. Definition und Entstehung

Bei Biofilmen handelt es sich um einen Zusammenschluss mehrerer Mikroorganismen, in erster Linie Bakterien, die an einer Grenzfläche haften und von einer extrazellulären polymeren Substanz (EPS) umgeben sind.

Die Entstehung von Biofilmen (Abbildung 1) kann in vier wesentliche Schritte unterteilt werden:

1. Bewegung hin zur Oberfläche und reversible Bindung, 2. Irreversible Bindung, 3. Ausreifung der Biofilmstruktur und sekundäre Besiedlung, 4. Abschwämmen des Biofilms. Im ersten Schritt gelangen die Bakterien zur Zieloberfläche. In der einfachsten und auch langsamsten Form erfolgt dies per Diffusion, ermöglicht durch die Brownsche Bewegung. Häufiger aber gelangen Bakterien per konvektivem Transport mithilfe der Strömungen in einem flüssigen Medium zur Zieloberfläche. Motile Bakterien können sogar durch aktive Bewegung zur Oberfläche gelangen, wobei dies zufällig oder durch Chemotaxis erfolgen kann. Schließlich kommt es zu einer ersten Haftung an das Material. Diese ist zunächst reversibel, da sie auf schwachen Bindungen wie Van-der-Waals-Kräften basiert. Werden die ionischen Bindungen stärker, so kann auch der letzte Abstand überwunden werden und die Bindung ist nun irreversibel. Zu einer endgültigen Bindung an die Oberfläche kommt es schließlich, indem durch Fimbrien oder spezifische Polysaccharide unlösbare Verbindungen aufgebaut werden. Im dritten Schritt, der Kolonialisierung, siedeln sich weitere Bakterien an, sodass über Mikrokolonien und die Ausbildung der EPS schließlich ein reifer Biofilm entsteht. Bei einige Tage alten Biofilmen kommt es häufig zu Abschwämmungen, dem sogenannten Detachment. Hierbei können passiv der ganze Biofilm oder Teile davon verloren gehen oder die Bakterien aktiv wieder in ihre planktonische Form übergehen, um sich zu verbreiten (Kim und Lee 2016; Van Loosdrecht et al. 1990).



**Abbildung 1: Biofilmentstehung, modifiziert nach Sauer**

Dargestellt sind die vier wesentlichen Schritte der Biofilmentstehung: 1. Bewegung und reversible Bindung, 2. Irreversible Bindung, 3. Ausreifung der Biofilmstruktur und sekundäre Besiedlung, 4. Detachment / Abschwämmen des Biofilms (Sauer 2018).

Quorum Sensing spielt bei der Entstehung von Biofilmen ebenfalls eine Rolle. Als Quorum Sensing bezeichnet man eine chemische Zellkommunikation zwischen Bakterien, resultierend aus der Produktion bestimmter Signalmoleküle. Diese Moleküle, auch als Autoinducer bezeichnet, akkumulieren in der Umgebung der Bakterien. Bei Erreichen einer bestimmten Konzentration, dem Quorum, können diese Autoinducer an Oberflächenrezeptoren der Bakterien binden und bewirken eine Änderung der Genexpression. Dies führt in Folge auch zur Bildung von Biofilmen (Della Salla et al. 2019). Auch in bereits formierten Biofilmen kommunizieren die Bakterien über Quorum Sensing, sodass sie sich abhängig von ihrer Lokalisation innerhalb des Biofilms im Sinne einer Aufgabenteilung spezialisieren. Die sich in den äußeren Schichten befindenden Bakterien beispielsweise sind stoffwechselaktiver als die innenliegenden Bakterien und produzieren eine Schicht aus EPS, auch als Glykokalix bezeichnet, die den Biofilm umgibt. Sie besteht aus Proteinen, Polysacchariden, Nukleinsäuren und Lipiden, wobei ihre Zusammensetzung in Abhängigkeit der Bakterienart, des Alters des Biofilms und der Umgebung variiert (Kanematsu und Barry 2020). Die EPS sind maßgeblich an der Oberflächenhaftung des Biofilms beteiligt und stellen einen Schutz vor äußeren Einflüssen dar. Sie sind optisch und taktil als Schleimfilm zu erkennen. Ein großer Anteil des Biofilms besteht zudem aus Wasser. Zur Versorgung mit Nährstoffen sind

Wasserkanäle in den Biofilm eingebaut, über die auch Abfallstoffe wieder an die Umwelt abgegeben werden.

### 2.1.2. Vorkommen und Bedeutung

Biofilme können an nahezu allen Grenzflächen zwischen verschiedenen Phasen entstehen und führen deshalb in vielen Bereichen zu Problemen. Besonders hervorzuheben ist die Formation von Biofilmen in der Lebensmittelindustrie, da auch rostfreier Stahl, Kunststoffe und Glas als Besiedelungsgrundlage dienen können. Dies kann einerseits zur Beeinträchtigung der Materialqualität wie beispielsweise Korrosion führen, aber auch einen direkten Einfluss auf die menschliche Gesundheit nehmen. Ein schnellerer Verderb der mit den besiedelten Gerätschaften in Kontakt gekommenen Lebensmittel bis hin zu einer Lebensmittelinfektion oder -intoxikation durch (Re-) Kontamination sind die Folge (Galie et al. 2018).

Ebenfalls ein sehr großes Risiko stellt die Besiedelung von medizinischem Material dar. Nach Angaben des National Institutes of Health sind bei etwa 65 % aller bakteriellen Erkrankungen und 80 % aller chronischen Infektionen Biofilme beteiligt (Jamal et al. 2018). Zumeist werden diese Infektionen durch Biofilmbildung auf medizinischem Material wie Kathetern oder Implantaten übertragen. Aber auch Osteomyelitis nach einer Erregerausbreitung über das Blutssystem oder bakterielle Periodontitis, zumeist ausgelöst durch schlechte Mundhygiene, beruhen häufig auf einer Biofilmformation (Jamal et al. 2018).

Ein großes Problem bei der Behandlung solcher Infektionen ist, dass die verabreichten Antibiotika oder Desinfektionsmittel die Bakterien aufgrund der Schutzfunktion der EPS in zu geringer Konzentration erreichen und zusätzlich ein reger Gentransfer innerhalb des Biofilms zu einer erhöhten Resistenz gegen einwirkende Stoffe führen kann. Infektionen wie Periodontitis oder Osteomyelitis, bei denen Biofilme eine Rolle spielen, können zudem auch schlechter durch das Immunsystem bekämpft werden (Vogel und Quax 2019; Jamal et al. 2018).

### 2.1.3. Möglichkeiten der Bekämpfung

Da Biofilme sehr schwer zu eliminieren sind, ist das Vorbeugen der Entstehung ein wichtiger Teilaspekt in der Bekämpfung von Biofilmen. Hierzu werden unter anderem Chemikalien und physikalische Methoden wie heißer Wasserdampf oder Ultraschall eingesetzt, um sowohl Wasserleitungen als auch Oberflächen zu reinigen (Galie et al. 2018). Darüber hinaus wird intensiv am Einsatz verschiedener Beschichtungen mit Nanopartikeln geforscht, die die Entstehung eines Biofilms verhindern sollen. Besonders Silber scheint aufgrund seiner antimikrobiellen Eigenschaften gut geeignet zu sein, aber auch verschiedenen Metalloxide sind vielversprechend (Rai et al. 2016; Azam et al. 2012).



Eine der effektivsten Methoden, einen Biofilm zu entfernen, ist der Vorgang der mechanischen Abreibung. Diese Abrasion kann manuell erfolgen, in Gas- und Ölleitungen wird zudem die Molchtechnik eingesetzt, bei der ein kugelförmiger Gegenstand durch die Rohre gepresst wird und diese so reinigt (Kanematsu und Barry 2020). Für schwer zugängliche Stellen wie Krümmungen oder Kanten, an denen Biofilme besonders häufig entstehen, sind solche Maßnahmen jedoch weniger geeignet.

Des Weiteren werden zur Bekämpfung von Biofilmen oftmals Chemikalien verwendet. Eine Vielzahl an Bioziden und Desinfektionsmitteln kommt zu diesem Zweck zum Einsatz. Besonders häufig werden Reinigungsmittel auf Grundlage von Chlor genutzt, aber auch Wasserstoffperoxid, Ozon oder quarternäre Ammoniumverbindungen finden Verwendung (Galie et al. 2018). Da aber einzelne Bakterien bereits Resistenzen entwickelt haben, sind insbesondere Kombinationen aus verschiedenen Stoffen wie Salzlösungen, Chelatbildner, Tenside, Hypochlorite, Monochloramine und Lysozymen, teils auch kombiniert mit Antibiotika, sehr vielversprechend. (Chen und Stewart 2000). Viele dieser Verbindungen sind allerdings nicht in der Lage, die EPS zu durchdringen, weshalb es sinnvoll sein kann, diese zunächst in einem ersten Schritt zu bekämpfen. Aufgrund der Struktur der EPS sind dafür Proteasen, Glykosidasen und Nukleasen am besten geeignet. Solche Enzyme haben zudem den Vorteil, dass sie biologisch abbaubar und gering toxisch sind.

Ein relativ neuer Ansatz zur Behandlung der Problematik Biofilm mittels Enzyme ist der Einsatz von DNasen. Die Idee basiert darauf, dass extrazelluläre DNA (eDNA), die die Bindung von Bakterien an Oberflächen oder aneinander und somit eine Biofilmbildung fördert, durch DNasen abgebaut werden kann. DNasen scheinen vorrangig zur Prävention geeignet zu sein, denn gegen bereits ausgebildete Biofilme zeigen sie eine deutlich reduzierte Wirksamkeit. Der Effekt lässt sich jedoch durch die Zugabe von Magnesium verstärken (Sharma und Pagedar Singh 2018).

Ein Eingriff in die Kommunikation der Bakterien per Quorum Sensing stellt eine weitere interessante Möglichkeit dar, die Bildung von Biofilmen zu unterbinden. Dafür eignen sich Quorum Quenching (QQ)-Enzyme wie Lactonasen, Amidasen und Oxydoreduktasen, die in der Lage sind, QS-Signalmoleküle abzubauen und somit eine Biofilmbildung erschweren. Alternativ könnte bereits in die Synthese der Autoinducer eingegriffen werden, um schon deren Entstehung zu verhindern. Daneben ist Quorum Quenching auch in Form von Antagonisten der QS-Moleküle möglich, wodurch eine Wirkung der QS-Moleküle durch Blockierung der Oberflächenrezeptoren verhindert wird. (Vogel und Quax 2019). Ein Vorteil dieser Methoden ist, dass eine Resistenzentwicklung unwahrscheinlich ist, da die Bakterien zwar an ihrer Kommunikation untereinander gehindert werden, jedoch nicht absterben und somit kein Selektionsdruck entsteht.

Darüber hinaus stellen Bakteriophagen eine interessante Option für die Bekämpfung von Biofilmen dar. Die von den Bakteriophagen produzierten Lysine zerstören nicht nur Bakterien, sondern scheinen auch gegen mature Biofilme einsetzbar zu sein. Auch eine Isolierung und einzelne Verabreichung der Lysine zeigt einen ähnlichen Effekt auf die Biofilme. Der Einsatz von Bakteriophagen hat den Vorteil, dass bei gleichzeitiger Desinfektionsmittel- oder Antibiotikagabe diese wieder Wirkung zeigen und die Resistenzen somit durch Kombinationstherapie überwunden werden können (Schuch et al. 2017).

## 2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

### 2.2.1. Charakteristika

*Pseudomonas aeruginosa* gehören zur Gattung *Pseudomonas* der Familie Pseudomonadaceae. Es handelt sich um 4 - 5 µm lange und 1 µm breite Gram-negative Stäbchenbakterien, die sich durch ihre polaren Geißeln selbstständig fortbewegen können. Die Oberfläche von *P. aeruginosa* ist von Fimbrien bedeckt, die zur Haftung an Zelloberflächen dienen und die zuckende Bewegung von *P. aeruginosa* bedingen. *P. aeruginosa* sind nicht in der Lage, Sporen auszubilden, gehen aber bei Desinfektion mit ultraviolettem Licht in einen viable but nonculturable Status (lebend, aber nicht kultivierbar, VBNC) über, indem sie ihren Metabolismus soweit herunterfahren, dass zwar das Überleben gesichert ist, eine Zellteilung jedoch nicht stattfindet. Aus dem VBNC-Status können die Bakterien durch geeignete Stimulation wiederbelebt werden und sind anschließend wieder kultivierbar (Zhang et al. 2015). Unter aeroben Bedingungen können *P. aeruginosa* in einem breiten Temperaturspektrum von 4 - 42 °C wachsen, wobei das Optimum bei 37 °C liegt (Labauve und Wargo 2012). Aufgrund der Expression verschiedener terminaler Oxidasen sind *P. aeruginosa* zudem in der Lage, sich in mikroaerobem Milieu zu vermehren (Jo et al. 2014). Durch ihre minimalen nutritiven Ansprüche an die Umgebung ist selbst in destilliertem Wasser ein Wachstum möglich (Favero et al. 1971). Auf BHI-Agar bilden *P. aeruginosa* innerhalb von 24 h weißliche, 0,5 - 2 mm große, perlenartige oder cremige bis schleimige Kolonien.

Die Genomgröße von *P. aeruginosa* variiert stark, sie liegt zwischen 5,5 und 7 Megabasenpaaren (Mbp). Dabei besitzen alle Stämme ein Kerngenom, das nur sehr geringe Unterschiede von etwa 0,5 % aufweist (Wiehlmann et al. 2007; Spencer et al. 2003). Darüber hinaus gibt es für einzelne Subpopulationen oder gar Klone spezifische akzessorische Genomabschnitte unterschiedlicher Größe. Sie werden über horizontalen Gentransfer mosaikartig ins Kerngenom integriert und geben meist Hinweis auf eine Herkunft aus DNA-Abschnitten von Phagen, Transposons oder Insertionssequenzen. Die meisten werden durch eine weitere Mutation irreversibel ins Genom eingebunden, einige bleiben jedoch als mobile genetische Elemente erhalten. Diese Insertion geschieht nicht zufällig, sondern ist an bestimmte über das gesamte Genom verteilte Loci gebunden (Klockgether et al. 2011). Die

Masse an möglichen akzessorischen Genomabschnitten neben dem konservierten Kerngenoms erklärt die hohe Mutationsrate und gute Anpassungsfähigkeit von *P. aeruginosa* an sich verändernde Umweltbedingungen, die Infektiosität bei einer großen Bandbreite an Wirten und die schnelle und effektive Resistenzentwicklung gegen Antibiotika oder andere schädliche Einflüsse (Valot et al. 2015).

Die Pathogenität von *P. aeruginosa* zielt vor allem darauf ab, die Immunantwort des Wirts zu unterbinden. Sie ist multifaktoriell und basiert auf verschiedenen sezernierten Enzymen und Toxinen. Das bedeutendste Enzym ist dabei das Exotoxin A, das die Synthese von Proteinen in den Zellen des Wirtsorganismus unterbindet. Daneben gibt es das Exoenzym S, das zu einer gesteigerten Apoptose von T-Zellen führt und durch die daraus resultierende Hemmung des Immunsystems zur Virulenz von *P. aeruginosa* beiträgt (Bruno et al. 2000). Weitere Virulenzfaktoren stellen zwei Proteasen dar, die alkaline Protease und die Elastase. Beide können ein breites Spektrum an für die Immunität des Wirts wichtigen Proteinen abbauen. Das Glykolipid Rhamnolipid spielt bei der Virulenz ebenfalls eine Rolle, indem es sich in die Zellmembran der Wirtszellen integriert und somit die tight junctions unterbricht (Döring 1987). Auch die von *P. aeruginosa* produzierten Pigmente, wie Pyocyanin, Pyoverdin, Pyorubin und Pyomelanin, sind an der Virulenz beteiligt. Das bedeutendste und für *P. aeruginosa* besonders charakteristische Pigment ist dabei das Pyocyanin, das beim befallenen Wirt Zellschäden bis hin zum Zelltod auslösen kann (Hall et al. 2016). Alle genannten Pigmente scheinen auch für die Widerstandsfähigkeit von *P. aeruginosa* vor allem gegen photooxidativen Stress verantwortlich zu sein (Orlandi et al. 2015).

*P. aeruginosa* sind dafür bekannt, starke Biofilmbildner zu sein, wodurch sie besonders widerstandsfähig gegen antibiotische Behandlung sind. Die allgemeine Entstehung von Biofilmen ist unter 2.1.1. ausführlich beschrieben. Zunächst erfolgt ein Anheften der Bakterien an die Besiedlungsoberfläche, bei *P. aeruginosa* wird dies durch die Geißeln und Fimbrien gesteuert. Um letztendlich den Prozess der Biofilmbildung zu koordinieren, verfügen *P. aeruginosa* über drei verschiedene QS-Systeme, diese sind das Las-, Rhl- und *Pseudomonas* quinolone system (PQS)-System (Rasamiravaka et al. 2015). Die Hintergründe zu Quorum Sensing und die Rolle bei der Biofilmbildung sind ebenfalls unter 2.1.1. erläutert. Das PQS-System ist in erster Linie dafür verantwortlich, eDNA freizusetzen, wodurch eine Biofilmentstehung gefördert wird. Das Las-System spielt vor allem bei der Reifung des Biofilms eine Rolle, wohingegen das Rhl-System die Synthese von mehreren Biofilmkomponenten steuert. Neben der Produktion von Polysacchariden der EPS wird auch das Rhamnolipid synthetisiert, welches nicht nur die tight junctions der Wirtszellen unterbricht, sondern auch zur Formation von Mikrokolonien und der Ausbildung der dreidimensionalen Struktur der Biofilme beiträgt. Darüber hinaus gibt es weitere Bestandteile der QS-Systeme, die bei der Biofilmbildung eine Rolle zu spielen scheinen, deren genauer Mechanismus aber noch nicht

endgültig geklärt ist (Rasamiravaka et al. 2015). Einen Einfluss auf die Regulation der entsprechenden QS-Genexpressionen hat auch das Zweikomponentensystem GacS/GacA, bestehend aus der Sensor kinase GacS, welche auf bisher unbekannte Signale in der Umwelt reagiert und über eine Phosphorylierung das Regulatorprotein GacA aktiviert, wodurch neben der Transkription von Regulatorgenen auch die als Autoinducer bekannten N-Acyl-Homoserinlaktone aktiviert werden (Heeb und Haas 2001).

### 2.2.2. Vorkommen und Bedeutung

Durch ihre geringen Ansprüche an die Umgebung kommen *P. aeruginosa* ubiquitär vor, besonders aber in Feuchthabitaten wie Erde und Wasser. Ein großes Eintragsrisiko in Kliniken stellen deshalb die dortigen Wassersysteme dar (Wingender 2013). In den Wasserrohren sowie auf klinischen Geräten, insbesondere auf Kathetern und Beatmungsgeräten, bilden sie widerstandsfähige Biofilme, die das Risiko einer Sekundärinfektion erhöhen und die Behandlung der bereits vorerkrankten Patienten erschweren. Hinzu kommt, dass *P. aeruginosa* zu den ESKAPE-Pathogenen (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* - Spezies) gehört. Diese sechs Erreger nosokomialer Infektionen zeichnen sich durch Multiresistenzen aus, die sich bei *P. aeruginosa* hauptsächlich gegen Carbapeneme, Fluoroquinolone, Aminoglykoside und Cephalosporine der dritten Generation richten (Soukarieh et al. 2018).

Als opportunistische pathogene Erreger stellen *P. aeruginosa* vor allem für immunsupprimierte Patienten eine Gefahr dar und können schwerwiegende Wundinfektionen, Harnwegsinfektionen und Pneumonien verursachen. Hervorzuheben ist die Rolle von *P. aeruginosa* bei Patienten mit Cystischer Fibrose (CF). Es konnte gezeigt werden, dass 80 % der adulten CF-Lungen eine Kolonialisierung mit *P. aeruginosa* aufweisen (Latino et al. 2014). Prinzipiell können die Verläufe bei *P. aeruginosa*-Infektionen akut oder chronisch sein. Eine akute Infektion führt häufig zu einer Bakteriämie und resultiert in einer höheren Mortalität (Turner et al. 2014).

Eine ebenso große Rolle spielen *P. aeruginosa* in der Lebensmittelindustrie. Besonders in Schlachthöfen und lebensmittelverarbeitenden Betrieben können sie als starke Biofilmbildner humanpathogenen Bakterien wie beispielsweise *Campylobacter jejuni* eine Besiedelungsgrundlage bieten. Die feuchte Umgebung, das Vorhandensein von Nährstoffen und weitere biofilmfördernde Bakterien aus den zu verarbeitenden Produkten begünstigen eine solche Formation (Meliani und Bensoltane 2015).

Aber auch *P. aeruginosa* selbst können als Verderbererreger speziell in Erzeugnissen tierischer Herkunft für erhebliche Probleme sorgen. Die von *P. aeruginosa* sezernierten hitzestabilen lipo- und proteolytischen Enzyme werden durch eine Pasteurisation nicht zerstört und können

den Geschmack des Endprodukts negativ beeinflussen (Meliani und Bensoltane 2015). In anderen Produkten wie Fisch, Fleisch und pflanzlichen Lebensmitteln können sie durch Schleimbildung oder den für Pseudomonaden typischen Geruch das Produkt ungenießbar machen (Stellato et al. 2017). Da sich *P. aeruginosa* auch bei Temperaturen unter 10 °C vermehren können, sind sie einer der häufigsten Verderbserreger gekühlter Produkte.

Neben der gesundheitlichen Problematik stellen auch wirtschaftliche Verluste durch Verderb von Lebensmitteln ein Problem dar. Hinzu kommen notwendige häufigere Reinigungen und dadurch verkürzte Arbeitszeiten, reduzierter Durchlauf und geringere Hitzeleitfähigkeit in verstopften Leitungen und Korrosion der Materialien durch Biofilme (Cappitelli et al. 2014).

## 2.3. Bakteriophagen

### 2.3.1. Charakteristika

Bakteriophagen (Phagen) sind 24 bis 200 nm große Viren, deren Wirte Bakterien sind. Ihr Name leitet sich aus dem Griechischen „baktérion phageîn“ für Bakterienfresser ab. Auf der Erde sollen bis zu  $10^{31}$  Bakteriophagen vorkommen, die meisten davon sind jedoch noch nicht charakterisiert (Heller et al. 2011). Sie kommen ubiquitär vor, da sie immer dort zu finden sind, wo sich ihr Wirtsbakterium aufhält. Das Spektrum reicht dabei von extrem heißen Regionen wie der Sahara bis hin zu sehr kalten Umgebungen wie Binnengewässern in Polarregionen (Sharma et al. 2017).

Das Wirtsspektrum der einzelnen Phagen hingegen ist klein, da sie sehr spezifisch an die Rezeptoren auf der Bakterienoberfläche binden. Meist sind individuelle Bakteriophagen daher nur in der Lage, eine gewisse Anzahl von Stämmen einer Bakterienart zu lysieren. Um dieses Wirtsspektrum zu ermitteln, können Spot Assays durchgeführt werden, bei denen die Phagenlösung auf einen Bakterienrasen getropft wird, um eine eventuelle Lyse beobachten zu können. Daneben existiert die Efficiency of Plating (EOP), bei der der Phagentiter nach Vermehrung in einem ausgewählten Bakterienstamm und spezifisch für diesen ermittelt wird. Darin zeigt sich die Fähigkeit des Phagen, sich in diesem individuellen Stamm zu vermehren. Die EOP ist somit auch ein Indikator für die Ergiebigkeit einer Phageninfektion und wird auch von der Wurfgröße, also wie viele Virionen aus einer Zelle freigesetzt werden, beeinflusst. Der daraus ermittelte Phagentiter wird in Plaquebildenden Einheiten je Milliliter (PFU/ml) angegeben (Mirzaei und Nilsson 2015). Ein weiterer bedeutender Punkt bei der Infektionsfähigkeit der Bakteriophagen ist die Multiplizität der Infektion (MOI). Sie gibt an, in welchem Verhältnis die Phagen auf die Bakterien treffen. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass nicht alle zugeführten Phagen auch die Bakterien erreichen und eine Infektion bedingen, vor allem bei einer Anwendung auf Biofilmen (Abedon 2016). Trotzdem beeinflusst die MOI auch die Wurfgröße und hat somit ebenfalls Einfluss auf die EOP.



Abbildung 2: Stammbaum Bakteriophagen nach ICTV

Mit der Klassifizierung (Abbildung 2) von Bakteriophagen beschäftigt sich das Bacterial Viruses Subcommittee des International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Eine genaue Zuordnung der Bakteriophagen in das System des ICTV gestaltet sich aber aufgrund der noch immer fehlenden biologischen und experimentellen Daten als nahezu unmöglich (Chibani et al. 2019). Dennoch können etwa 96 % der Bakteriophagen der größten durch das ICTV klassifizierten Ordnung der *Caudovirales* zugeordnet werden (Thung et al. 2018; Ackermann 2011), auf welche aufgrund ihrer Häufigkeit näher eingegangen werden soll. Namensgebend ist bei diesen Phagen das Schwanzstück (Abbildung 3) anhand dessen Struktur sie weiter unterteilt werden. Bei den *Myoviridae* ist der Schwanz lang und kontraktile. Damit besteht der Unterschied zu den *Siphoviridae*, deren Schwanz ebenfalls lang und flexibel, aber nicht kontraktile ist. *Podoviridae* hingegen haben sehr kurze und nicht kontraktile Schwanzstücke. Das Schwanzstück ist von der Schwanzscheide umgeben und bei allen drei Gruppen hohl, um die Nukleinsäuren bei einer Infektion passieren zu lassen. Am kopffernen Ende des Schwanzstückes befindet sich bei den *Caudovirales* die Basalplatte, auch Schwanzspitzenkomplex genannt. Daran befestigt sind Fiberproteine und ein zentraler Spike. Beide Strukturen dienen der Bindung der Bakteriophagen an die Rezeptoren der Bakterienoberfläche (Campbell 2019). Diese sind bei Gram-negativen Bakterien zumeist Lipopolysaccharide und bei Gram-positiven Bakterien Teichonsäuren. Diese Rezeptoren sind

letztendlich ausschlaggebend dafür, ob ein Phage an die Bakterienoberfläche binden und das Bakterium lysieren kann.

Über einen Kragen sind die Schwanzstücke mit den Kopfstücken, den Capsiden, verbunden. Während die Aufgabe des Kragens lediglich darin besteht, während des Assemblies Schwanz- und Kopfstück zu verbinden, erfüllen die Capside die wichtige Funktion, das Phagengenom zu verpacken.

Bei den *Caudovirales* liegen die Nukleinsäuren als Doppelstrang DNA (dsDNA) in einem ikosaedrischen oder ähnlich geformten Capsid vor. Die Genomgröße liegt zwischen 11,5 und 500 Kilobasenpaaren (kbp) und weist eine große Diversität innerhalb der Phagenpopulation auf. Die mosaikartige Anordnung des Genoms gibt Hinweis auf einen regen horizontalen Gentransfer (Hatfull und Hendrix 2011).

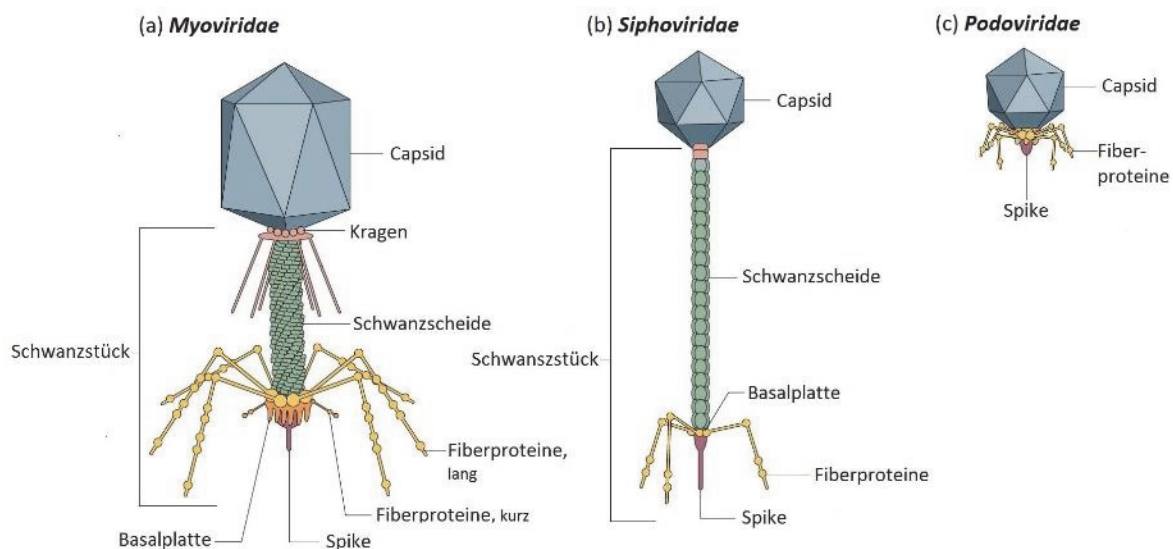


Abbildung 3: Aufbau der Caudovirales, modifiziert nach Nobrega et al.

Bei allen *Caudovirales* liegt das Genom in einem ikosaedrischen Capsid verpackt vor. Unterschiede bestehen in den Schwanzstücken. (a) *Myoviridae* verfügen über ein langes, kontraktiles Schwanzstück, an dessen Ende sich die Basalplatte mit den Fiberproteinen und dem zentralen Spike befindet. (b) *Siphoviridae* sind vergleichbar aufgebaut, das Schwanzstück ist jedoch nicht kontraktile. (c) *Podoviridae* hingegen haben einen kurzen Schwanz und verfügen über keine Basalplatte (Nobrega et al. 2018).

Neben den *Caudovirales* gibt es weitere Bakteriophagen, die über eine dsDNA verfügen und die anhand ihrer Morphologie bzw. ihrer Capsidformen weiter eingeteilt werden können (Abbildung 4). Dabei handelt es sich um die ebenfalls ikosaedrischen *Corticoviridae* und *Tectiviridae*, die pleomorph geformten *Plasmaviridae* und *Fuselloviridae*, sowie die den *Ligamenvirales* zugeordneten filamentösen behüllten *Lipothrixviridae* und die stäbchenförmigen *Rudiviridae*.

Daneben gibt es auch Bakteriophagen mit Singelstrang DNA (ssDNA), dazu zählen die beiden Familien der ikosaedrischen *Microviridae* und der filamentösen *Inoviridae*. Bei deutlich weniger Bakteriophagen liegt die Nukleinsäure in Form einer RNA vor. Beschrieben sind bisher die *Leviviridae* (ssRNA) und die behüllten *Cystoviridae* (dsRNA). Bei beiden sind die Genome in ikosaedrischen Capsiden verpackt (Thung et al. 2018; Ackermann 2001).

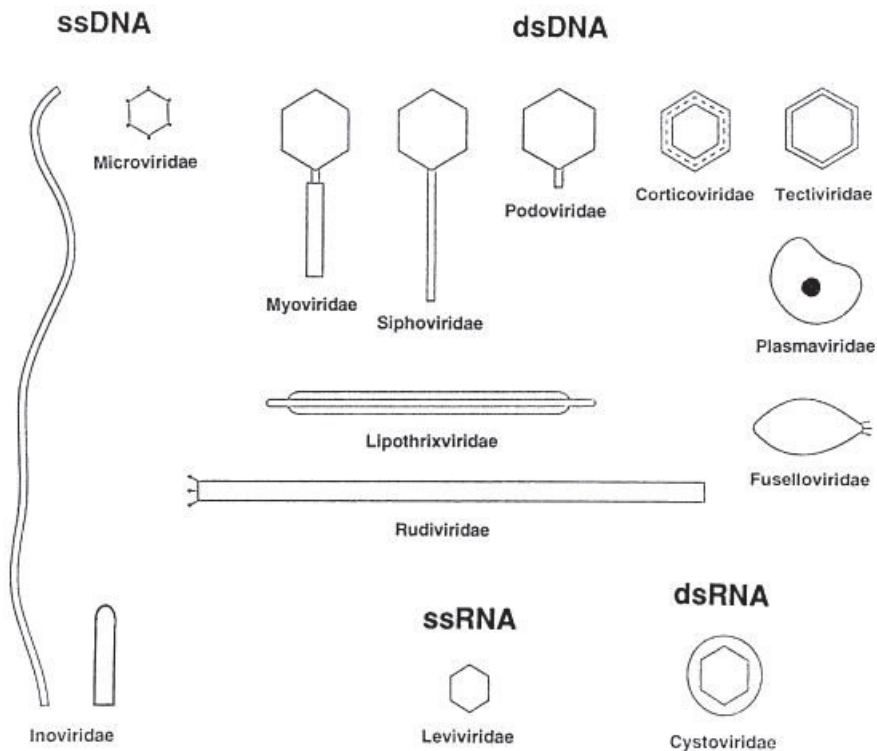


Abbildung 4: Einteilung von Bakteriophagen, modifiziert nach Thung et al.

Bakteriophagen können anhand ihrer Nukleinsäuren und ihrer Morphologie in 13 Familien eingeteilt werden. Neun davon verfügen über eine dsDNA (*Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Plasmaviridae*, *Fuselloviridae*, *Lipothrixviridae*, *Rudoviridae*) und zwei Familien über eine ssDNA (*Inoviridae*, *Microviridae*). Jeweils eine Familie besitzt dsRNA (*Cystoviridae*) und ssRNA (*Leviviridae*). (Thung et al. 2018)

### 2.3.2. Lebenszyklus und Lyseformen

Man unterscheidet bei Bakteriophagen anhand ihres Lebenszyklus zwischen virulenten und temperenten Phagen. Der Zyklus der virulenten Phagen wird als lytisch bezeichnet, der der temperenten als lysogen (Abbildung 5).

Die Initialisierung der Infektion verläuft bei beiden Zyklen gleich. Die *Myoviridae* und *Siphoviridae* docken mit den Fiberproteinen ihrer Basalplatte an den Oberflächenrezeptoren ihres Wirtsbakteriums an. Dies führt zu einer Konformationsänderung der Basalplatte, wodurch die Bindung stabilisiert wird (Maghsoodi et al. 2019). Ist der Bakteriophage irreversibel an das Bakterium gebunden, wird das Genmaterial in die Wirtszelle freigesetzt. Bei *Myoviridae* erfolgt dies durch Kontraktion der Schwanzscheide, dadurch wird das Schwanzrohr durch die



Zellwand gestoßen und die DNA in die Wirtszelle injiziert. Da *Podoviridae* über keinen Schwanz und keine Basalplatte verfügen, lysieren sie die Bakterienmembran enzymatisch und ein Großteil der DNA wird durch den hohen Druck im Inneren des Capsids freigesetzt. Im weiteren Verlauf wird die restliche DNA durch bereits gebildete frühe virale Proteine in die Wirtszelle gezogen (Gonzalez-Huici et al. 2004). Mit einem ähnlichen Mechanismus agieren auch die *Siphoviridae*. Sie hydrolysieren die Bakterienzellwand und durchdringen diese mit ihrem Schwanzteil. Durch den sich dabei veränderten osmotischen Druck wird die DNA in die Wirtszelle freigesetzt (Raspud et al. 2007). Anschließend wird beim lytischen Zyklus die DNA vom Replikationssystem des Wirtes abgelesen und kopiert. Die so entstandenen Proteinbausteine des Virus werden anschließend in einer bestimmten Schrittabfolge zusammengesetzt und im Burst, bei welchem die Wirtszelle zerstört wird, die fertigen Virionen freigesetzt (Campbell 2019). Beim lysogenen Zyklus hingegen kommt es nicht unmittelbar zu einer Produktion neuer Virionen. Nach dem Injizieren der DNA wird das genetische Material des Virus in Form eines Prophagen in das Genom des Wirtes eingebaut. Bei jeder Zellteilung des Bakteriums wird so auch das virale Genmaterial verdoppelt. Ist der Wirt einem Stressfaktor ausgesetzt, kann der temperente Phage wieder in den lytischen Zyklus übergehen, die DNA wird vervielfältigt, abgelesen und die Wirtszelle bei der Freisetzung der neu zusammengesetzten Phagen zerstört (Heller et al. 2011). Da der Phage im Genom des Bakteriums eingebaut war, kann es bei der Aktivierung vorkommen, dass Sequenzen der bakteriellen DNA in die des Phagen übergehen. Dies stellte ein Problem bei der Verbreitung von Resistenzen dar.

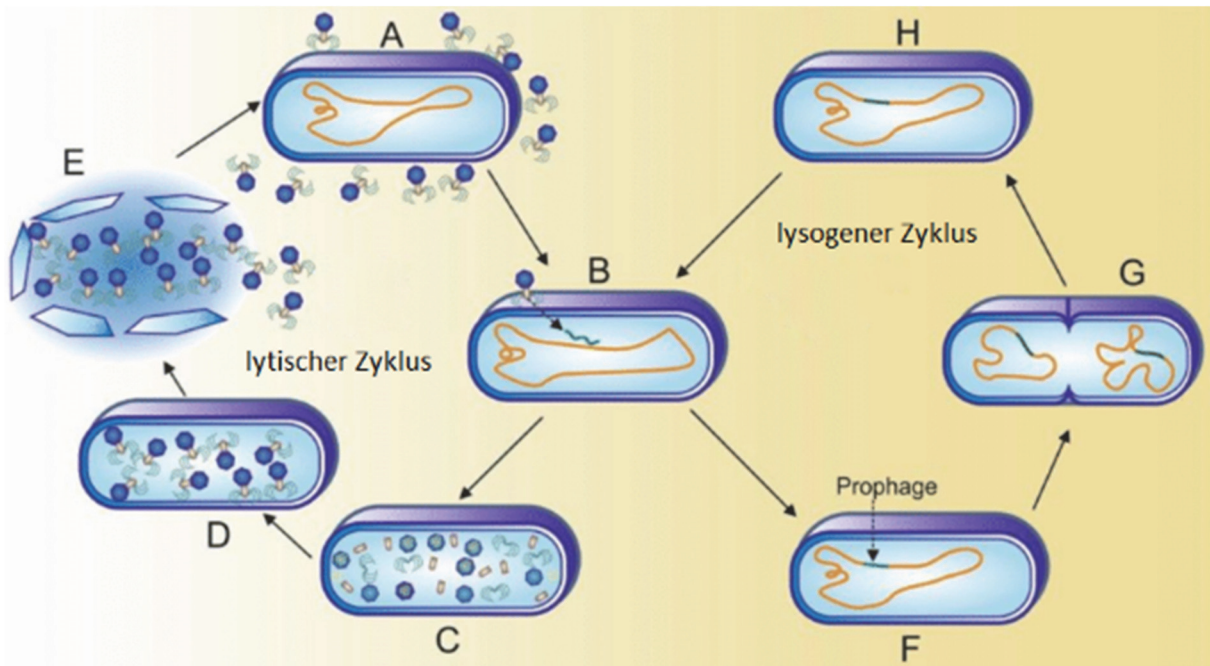


Abbildung 5: Zyklen der Phagenvermehrung, modifiziert nach Pyzik et al.

Bakteriophagen können sich über zwei verschiedene Zyklen vermehren. In beiden Fällen erfolgt nach der Bindung an den Rezeptor eine Freisetzung der Nukleinsäure in die Wirtszelle (A und B). Beim lytischen Zyklus wird diese anschließend durch die Wirtszelle vermehrt, abgelesen und der Phage zusammgebaut und einhergehend mit der Zerstörung der Wirtszelle freigesetzt (C bis E). Beim lysogenen Zyklus wird die Nukleinsäure zunächst als Prophage in das Wirtsgenom eingebaut und erst bei Stressinduktion repliziert (F bis H). (Pyzik et al. 2021)

Eine besondere Form der Lyse, zu der jedoch nicht alle Bakteriophagen in der Lage sind, stellt die Lyse von außen dar. In diesem Fall ist die Anzahl der angreifenden Phagen so hoch, dass es zu einer Lyse der Wirtszelle ohne vorherige Replikation der Bakteriophagen kommt. Diese Sonderform der Lyse erfolgt, wenn durch Virion-assoziierte Peptidoglycan-Hydrolasen so viele Löcher in der Zellwand des Bakteriums entstehen, dass die Wirtszelle abstirbt. Es kann aber auch vorkommen, dass eine so große Anzahl an Phagen-DNA aufgenommen wird, dass der Replikationsmechanismus der Zelle überfordert ist und die Wirtszelle daraufhin abstirbt. Dies ist vor allem bei Phagen mit großem Genom beschrieben (Abedon 2011).

### 2.3.3. Resistenzentwicklung von Bakterien gegen Phagen sowie Koevolution

Ein Hindernis bei der therapeutischen Applikation von Bakteriophagen ist die Resistenzentwicklung der Bakterien, die auf verschiedenen Mechanismen beruhen kann. Für eine erfolgreiche Infektion durch Bakteriophagen ist die Bindung an den Oberflächenrezeptoren der Bakterien Voraussetzung. Dies können Bakterien verhindern, indem sie die Konformation des Rezeptors ändern. Einige Bakterien synthetisieren extrazelluläre Matrix, die die Rezeptoren maskiert und eine physikalische Barriere für die Bakteriophagen darstellt. Diese kann jedoch wiederum durch die Phagen hydrolisiert werden.

Ein weiterer Mechanismus, um eine Bindung der Phagen an die Rezeptoren zu vermeiden, ist die Produktion von Molekülen, die als Antagonisten an ebenjenen Rezeptoren binden und diese somit blockieren (Oechslin 2018). Viele Phagen sind jedoch in der Lage, ihren Rezeptortropismus zu erweitern beziehungsweise eine Konformationsänderung des Rezeptors zu erkennen und weiterhin zu binden (Samson et al. 2013).

Des Weiteren kann die Injektion des Phagengenoms von einigen Bakterien verhindert werden. Dabei nutzen sie das „superinfection exclusion“ (Sie)-System. Es handelt sich dabei zumeist um in der Membran verankerte Proteine, die durch einen dem angreifenden Phagen eng verwandten Prophagen codiert werden. Diese membranassoziierten Proteine verhindern durch Interaktion mit Phagenproteinen eine DNA-Injektion und lassen den angreifenden Phagen häufig nicht infektiös zurück (Seed 2015).

Um sich gegen fremde invasive DNA zu schützen, verfügen viele Bakterien über das restriction/ modification (R/ M)-System. Die Wirkung basiert auf der Restriktionsendonuklease, die die fremde DNA anhand ihres Methylierungsmusters erkennt und schneidet, sowie weiteren Endonukleasen, die die eingedrungene DNA vollständig abbauen. Das R/ M-System greift jedoch nur bei dsDNA. Bakteriophagen mit ssDNA- oder RNA-Genomen werden nicht durch das R/ M-System eliminiert. Zudem können Phagen ihrerseits Resistenzen gegen diese Abwehrmechanismen entwickeln, indem bestimmte Abschnitte der DNA maskiert oder die Schnittstelle für das Restriktionsenzym per Punktmutation verloren geht (Samson et al. 2013). Auch das CRISPR-Cas System spielt eine Rolle bei der Resistenz gegen Bakteriophagen. Es besteht aus einer Gruppe von "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" (in regelmäßigen Abständen gruppierte kurze palindromische Wiederholungen, CRISPR) innerhalb des bakteriellen Genoms und den CRISPR-assoziierten (Cas) Proteinen. Das System basiert darauf, dass fremde Nukleinsäuren als Protospacer in die CRISPR-Reihe eingebaut werden. Die daraus abgelesenen cr-RNAs bilden Komplexe mit den Cas-Proteinen, die die fremde Nukleinsäure erkennen, sodass sie abgebaut werden kann. Häufig beinhaltet die CRISPR-Reihe auch selbsterkennende Protospacer und es gibt Hinweise, dass das CRISPR-Cas System weniger vor einer Infektion durch Bakteriophagen schützt, als vielmehr eine Apoptose der Wirtszelle auslöst. Somit wird lediglich eine Replikation der Phagen verhindert und der Infektionsdruck gesenkt (Strotskaya et al. 2017). Phagen entgehen jedoch auch diesem System durch verschiedene Mechanismen wie anti-CRISPR Gene, die sie vermutlich durch horizontalen Gentransfer austauschen. Auch eine Punktmutation in der zum Protospacer komplementären Sequenz führt dazu, dass das CRISPR-Cas-System des Wirts diesen nicht mehr erkennt, ebenso wie die komplette Deletion der Protospacer-Sequenz. Voraussetzung ist hierbei, dass der Phagen dadurch keine Fitnessverluste hat. Einige Phagen verfügen über eigene CRISPR-Cas Systeme, die das Abwehrsystem des Wirts erkennen und inaktivieren (Samson et al. 2013; Labrie et al. 2010).

Eine ähnliche Wirkung hat das „abortive infection“ (Abi) System. Es handelt sich hierbei aber, im Gegensatz zum CRISPR-Cas System, um ein angeborenes Immunsystem der Bakterien in Form von einzelnen Proteinen oder Proteinkomplexen. Diese reagieren auf verschiedene Stufen der Replikation der Bakteriophagen und führen vor der Freisetzung der neuen Phagen zu einem Zelltod des Bakteriums, um so die weitere Bakterienpopulation zu schützen (Labrie et al. 2010). Eine Untergruppe ist das Toxin-Antitoxin System, dessen Gleichgewicht bei zellulärem Stress zur Seite des Toxins verschoben wird und so den Zelltod auslöst. Auch können durch Abi Systeme Zellwandkanäle eingebaut werden, die das Membranpotential durcheinanderbringen und somit ein Wachstum des Bakteriums sowie die Phageninfektion verhindern (Samson et al. 2013).

Ein bedeutender Aspekt der Resistenzentwicklung gegen Bakteriophagen ist zudem auch, dass die Resistenz häufig mit einer reduzierten Fitness, einem Verlust der Infektiosität oder Virulenz der Bakterien einhergeht. Das ist insbesondere der Fall, wenn Oberflächenstrukturen bzw. der Phänotyp des Bakteriums betroffen sind. Dieser Effekt kann auch als Therapieansatz genutzt werden, indem Bakterienpopulationen mit reduzierter Fitness forciert werden. Häufig verlieren Bakterien im Zuge dessen auch ihre Antibiotikaresistenz, wodurch eine Kombinationstherapie erfolgversprechend erscheint (Mangalea und Duerkop 2020).

Vermutlich sind noch viele weitere Resistenzmechanismen gegen Bakteriophagen unentdeckt. Im Sinne einer Koevolution haben Phagen jedoch Wege gefunden, diesen Mechanismen zu entgehen und werden das auch in Zukunft tun. Vermutet wird daher ein „Wettrüsten“, die sogenannte Red Queen Hypothese. Die Idee dahinter ist, dass die Bakterien permanent Resistenzen gegen Bakteriophagen ausbilden und letztere wiederum fortwährend neue Strategien entwickeln, um die resistenten Bakterien weiter infizieren zu können (Heilmann et al. 2012). Dem gegenüber steht die Asymmetrie Hypothese, die davon ausgeht, dass über eine längere Zeit der Wirtsorganismus durch Fitnessverlust oder eine langsamere Evolution benachteiligt ist und der parasitäre Organismus das Gleichgewicht zu seinen Gunsten verändert (Lapchin und Guillemaud 2005). Die vielen Modelle zur Koexistenz zwischen Bakterien und Phagen belegen eher die Red Queen Hypothese, zumindest über einen Zeitraum von mindestens 1.000 Bakteriengenerationen (Heilmann et al. 2012). Dies ist auch darauf zurückzuführen, dass die überlebenden Bakterien Formationen wie Biofilme bilden, die sie gegen die Phagen schützen können und die Koexistenz so verstärken. Dies scheint auch der Fall zu sein, wenn Bedingungen stark zum Nachteil eines der beiden Organismen verändert werden. Nur wenn Phagen extrem effektiv bzw. ineffektiv sind, bricht das Gleichgewicht zusammen – Bakterien oder Phagen sterben aus (Heilmann et al. 2012).

#### 2.3.4. Einsatz im Klinik- und Lebensmittelbereich

Bakteriophagen sind seit dem Jahr 1917 bekannt. Als ihr Entdecker und Namensgeber gilt Félix d'Hérelle, der auch erste Therapieversuche mit Bakteriophagen startete. In den osteuropäischen Ländern sind sie seitdem Bestandteil der Forschung, wohingegen sie in den westlichen Staaten durch die Entdeckung der Antibiotika in den 1940ern wieder in Vergessenheit geraten sind. Heute gewinnen sie aber durch die fortschreitenden Antibiotikaresistenzen der Bakterien wieder an Bedeutung.

Es gibt zahlreiche Studien zum klinischen Einsatz von Bakteriophagen, hier sollen nur einige Beispiele zum Einsatz gegen *P. aeruginosa* beschrieben werden. So zeigen beispielsweise Untersuchungen in Modellen mit Mäusen, dass sich mit einer Applikation von Phagen einer Lungeninfektion nicht nur vorbeugen, sondern auch behandeln lässt (Debarbieux et al. 2010). Auch bei mit *P. aeruginosa* infizierten Brandwunden konnte die Mortalität unter Mäusen durch eine Behandlung mit Bakteriophagen gesenkt werden (Mcvay et al. 2007). Bei einer von *P. aeruginosa* ausgelösten Otitis bei Hunden scheint eine lokale Verabreichung von Bakteriophagen die Bakterien innerhalb von 48 h zu lysieren und eine Heilung zu ermöglichen (Hawkins et al. 2010). Trotz der vielversprechenden Ergebnisse werden Bakteriophagen noch nicht routinemäßig eingesetzt, jedoch gibt es weltweit verschiedene Phagenzentren, in denen eine Behandlung möglich ist. Vorreiter ist hier das Phage Therapy Center in Georgien, das auf seiner Internetseite „effektive Behandlungslösungen für Patienten mit schweren bzw. nicht heilbaren, chronischen, antibiotikaresistenten bakteriellen Infektionen“ verspricht (Phagetherapycenter 2004). Ebenfalls in Georgien lassen sich bereits Phagenlösungen in Apotheken kaufen, beispielsweise das Produkt Intesti Bacteriophage der Firma ELIAVA. Dieses besteht aus einem Cocktail von Phagen gegen verschiedene Bakterien (u.a. *P. aeruginosa*) und soll bei Infektionen des Magen-Darm-Traktes sowie diesen vorbeugend eingesetzt werden (Eliavabiopreparations 1923). Aber auch in Ländern der Europäischen Union gibt es die Möglichkeit, sich mithilfe von Bakteriophagen behandeln zu lassen. Beispielsweise sind am Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy in Warschau Phagenlösungen gegen 15 Bakterien vorrätig. Patienten bekommen nach einer Analyse von Blut- oder Urinproben einen Phagencocktail erstellt, sollte die Infektion durch eines dieser Bakterien ausgelöst sein. Die Behandlung kann anschließend zu Hause erfolgen und soll im Durchschnitt sechs bis acht Wochen dauern (Therapy 2005).

Auch in der Lebensmittelindustrie wächst das Interesse an Bakteriophagen: In den USA gibt es bereits verschiedene Phagenlösungen zum Einsatz im Lebensmittelbereich, insbesondere gegen *Listeria* spp., aber auch *Salmonella* und *Escherichia coli*. Dabei ist nicht nur ein direkter Einsatz in oder auf Lebensmitteln von Bedeutung, sondern auch die Dekontamination von Oberflächen und Materialien in Lebensmittelverarbeitungsbetrieben. Hier stellen insbesondere

Biofilme ein großes Kontaminationsrisiko dar, die von den Phagen unter anderem dank ihrer phageneigenen Proteine wie Endolysine und Depolymerasen angegriffen werden können. Die rechtliche Lage zum Einsatz von Bakteriophagen ist in der EU noch nicht endgültig geklärt. Das liegt vor allem daran, dass die Einstufung der Bakteriophagen unklar ist. Diskutiert wird, ob Phagen als Verarbeitungshilfsstoff oder Lebensmittelzusatzstoff zu klassifizieren sind. Beide sind laut VO (EG) Nr. 1333/2008 Abs. (5) und (6) Stoffe, die nicht als Lebensmittel verzehrt werden, aber aus technologischen Gründen Lebensmitteln zugesetzt werden. Lebensmittelzusatzstoffe haben im Endprodukt noch direkten Einfluss auf das Lebensmittel und werden mit diesem verzehrt, folglich müssen sie deklariert werden. Verarbeitungshilfsstoffe sind für den Herstellungsprozess notwendig und dürfen im Endprodukt lediglich in einem technisch unvermeidbaren Maß vorkommen. Sie haben keinen Einfluss mehr auf das Endprodukt und müssen nicht deklariert werden. Der Anspruch an die einzusetzenden Phagen sollte aber in jedem Fall sein, dass sie lytische Wirkung auf eine große Bandbreite von Bakterienstämmen haben, frei von Virulenz- und Resistenzfaktoren sind, aus Lebensmitteln isoliert und auf apathogenen Stämmen vermehrt wurden (Horn 2020). Zudem sollten Bakteriophagen trotz ihres natürlichen Vorkommens in Lebensmitteln auf ihr Allergenpotential untersucht werden. Es gibt bis dato keine Studien, die sich mit dem Einfluss von Phagen auf das menschliche Immunsystem und die Zytokinlevel beschäftigen (Kwiatek et al. 2020).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Nährmedien

In Tabelle 1 sind die verwendeten Nährmedien aufgeführt. Die Nährmedien wurden nach Herstellerangaben angesetzt.

Tabelle 1: Nährmedien

Nährmedium	Hersteller	Artikelnummer
Brain-Heart-Infusion (BHI)	Merck, Darmstadt, D	VM904693948
Mueller-Hinton-Broth (MHBr)	Oxoid, Basingstoke, UK	CM0405
Plate-Count-Agar (PC)	VWR, Leuven, BEL	L0133W

##### 3.1.2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agar Pulver	VWR, Leuven, BEL
Crystal Violet, 1% aqueous solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

##### 3.1.3. Bakterienstämme

Der überwiegende Anteil der 30 *Pseudomonas aeruginosa* - Stämme (Tabelle 3) wurde vom Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen (IMT) und dem Institut für Tier- und Umwelthygiene (ITU) der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt. Einer der *P. aeruginosa*-Stämme war am Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene (ILH) isoliert worden. Als Referenzstamm wurde ein *P. aeruginosa*-Stamm der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) verwendet.

Alle Stämme wurden bei -80 °C in einer Cryobank gelagert und auf BHI-Platte oder in BHI-Medium bei 37 °C für 24 h in aerober Atmosphäre angezüchtet.

Tabelle 3: Eingesetzte Bakterienstämme

<b>Spezies</b>	<b>Stamm</b>	<b>Matrix</b>
<i>P. aeruginosa</i>	DSM 25641	Patient (DSMZ)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02202	Schnittlauch (ILH)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02672	Ohrsekret Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02673	Ohrsekret Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02674	Blutkultur (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02675	Trinkwasser Masthuhn (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02676	Mastitis Rind (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02677	Abszess Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02678	Wundtupfer Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02679	Tracheal-/ Bronchialsekret Katze (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02680	Phlegmone Pferd (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02681	Sepsis Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02755	Sockentupfer Mastpute (ITU)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02756	Trinkwasser Masthuhn (ITU)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02757	Sammelkot MasITUuhn (ITU)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02759	Sammelkot MasITUuhn (ITU)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02763	Kloakentupfer MasITUuhn (ITU)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02774	Ohrsekret Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02775	Wundtupfer Pferd (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02776	Hauttupfer Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02777	Hauttupfer Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02778	Auge Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02779	Hauttupfer Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02780	Ohrsekret Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02781	Hauttupfer Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02782	Ohrsekret Katze (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02783	Hauttupfer Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02784	Hauttupfer Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02785	Hauttupfer Hund (IMT)
<i>P. aeruginosa</i>	ILH 02786	Blutkultur Hund (IMT)

### 3.1.4. Bakteriophagen

Die Bakteriophagen wurden bei 5 °C gelagert. Das Wachstum erfolgte per Flüssigvermehrung mit *P. aeruginosa* DMS 25641 in BHI-Medium. Der Bakteriophage vB\_Pae-TbilisiM32 wurde von der DSMZ erworben, der Bakteriophage vB\_Pae-CS2310 gemeinsam mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) aus einer Probe am Institut für Lebensmittelsicherheit und –hygiene isoliert.



### 3.1.5. Geräte und Software

Alle verwendeten Geräte sind in Tabelle 4 gelistet. Die zur Auswertung genutzte Software zeigt Tabelle 5.

Tabelle 4: Geräte

Gerät	Hersteller
Biologische Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
BioTek EL800 Microplate Reader	BioTek Instruments, Winooski, USA
Cryo Bank, -80 °C	Sanyo E&E Europe, Etten-Leur, NL
Inkubator Typ 700, 37 °C	Memmert, Schwabach, D
Kühlinkubator INCU-Line 240CR Premium, 12 °C	VWR, Leuven, BEL
Plattformschüttler Unimax 1010 mit Inkubationshaube	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Präzisionswaage Kern EW 2200 - 2 NM	Kern & Sohn, Balingen, D
Vortex-Genie 2	Bender + Hoben AG, Bruchsal, D
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D

Tabelle 5: Software

Software	Hersteller
Geneious Prime 2021.2	Biomatters, Ltd., Auckland, New Zealand
Gen5 Version	BioTek Instruments, Winooski, VT, USA
GraphPad-Prism Version 8.0	GraphPad-Software, Inc., La Jolla, USA
MyDbFinder 2.0	Center for Genomic Epidemiology, <a href="http://cge.cbs.dtu.dk/services">cge.cbs.dtu.dk/services</a>
PATRIC 3.6.9	Bioinformation Resource Centers, <a href="http://patricbrc.org">patricbrc.org</a>
RAST 2.0	<a href="http://rast.nmpdr.org/rast.cgi">rast.nmpdr.org/rast.cgi</a> (Aziz et al. 2008)

### 3.1.6. Verbrauchsmaterialien

Die Einweg-Verbrauchsmaterialien wurden, falls nicht anders in Tabelle 6 angegeben, von den Firma Nerbe plus (Winsen/ Luhe, D) sowie Sarstedt (Nümbrecht, D) und VWR (Dresden, D) bezogen.

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Cryobank-Röhrchen	Mast Diagnostica, Reinfeld, D
Falcon 96-Well, Flat-Bottom Microplate, uncoated	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Petrischalen	Greiner Bio-One, Mosonmagyaróvár, HUN

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Herstellung des Softagars

100 ml BHI-Medium wurden mit 0,5 g Agar vermischt und drei Mal bis zum Siedepunkt erhitzt. Der erhaltene Softagar wurde im Wasserbad bei 50 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

### 3.2.2. Übernachtkultur und Flüssigkultur

Um eine Übernachtkultur zu erhalten, wurden 2 ml BHI-Medium in ein Reagenzglas vorgelegt und ein bis drei *P. aeruginosa*-Kolonien darin gelöst. Die Kultur wurde für 24 h bei 37 °C aerob bebrütet. Alternativ wurden zur Herstellung einer Flüssigkultur drei bis fünf *P. aeruginosa*-Kolonien in 2 ml BHI-Medium gelöst und die Kultur vier Stunden bei 37 °C unter aeroben Bedingungen im Rüttler bebrütet.

### 3.2.3. Tropfplattenverfahren

Zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (CFU) wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe der Ausgangskultur in PBS-Medium hergestellt. Jeweils 50 µl der Verdünnungsstufen bzw. 100 µl der ersten Verdünnungsstufe wurden auf BHI-Platten ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C bebrütet. Gezählt wurden Verdünnungsstufen mit einer Koloniezahl zwischen drei und 300 und damit die CFU per gewogenem arithmetischem Mittelwert mit der Farmiloe'schen Formel berechnet.

$$n = \frac{\Sigma c}{n1 * 1 + n2 * 0,1} * d$$

- $n$  gewogener arithmetischer Mittelwert  
 $\Sigma c$  Summe aller Kolonien der Platten, die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und nächsthöhere auswertbare Verdünnungsstufe)  
 $n1$  Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe  
 $n2$  Anzahl der Platten der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe  
 $d$  Verdünnungsfaktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

### 3.2.4. Phagenvermehrung

100 µl des Phagenlysats wurden zu 100 ml bakterieller Übernachtkultur gegeben und erneut bei 37 °C für 24 h bebrütet. Diese Kultur wurde bei 7200 rcf zentrifugiert und der Überstand durch einen 0,22 µm Filter sterilfiltriert. Anschließend wurde der Phagentiter ermittelt.

### 3.2.5. Plaque Assay zur Ermittlung des Phagentiters

Eine 1:10 Verdünnungsreihe des Phagenlysats in PBS-Medium wurde vorbereitet. Je 100 µl der Verdünnungsstufen wurden mit 100 µl Übernachtskultur von *P. aeruginosa* DSM 25641 vermengt. Anschließend wurden 5,5 ml Softagar zugegeben und nach mehrmaligem Schwenken in leere Petrischalen gegossen. Durch Drehbewegungen wurde der Softagar gleichmäßig verteilt und vollständig trocknen gelassen. Die Inkubation der Platten erfolgte über 24 h bei 37 °C. Die PFU wurde unter Zuhilfenahme der Farmiloe'schen Formel berechnet.

### 3.2.6. Spot Assay zur Ermittlung des Wirtsspektrums

Von den zu untersuchenden *P. aeruginosa* - Stämmen wurden 2 ml Flüssigkultur hergestellt. Je 100 µl dieser Flüssigkulturen wurden mit 3,5 ml Softagar vermischt und BHI- bzw. PC-Platten damit überschichtet. Der Agar wurde vollständig trocknen gelassen, bevor je 5 µl der einzelnen Phagenlysate vB\_Pae\_Tbilisi32, vB\_Pae\_CS2310, des Cocktails sowie BHI-Medium als Negativkontrolle aufgetropft wurden. Die Tropfen sollten vor der Inkubation bei 37 °C für 24 h vollständig getrocknet sein. Zur Ermittlung des Wirtsspektrums wurden alle Stämme drei Mal getestet und ein Stamm galt als empfindlich, wenn er bei mindestens zwei der Durchgänge lysiert wurde.

### 3.2.7. Zellzahlreduktion durch Bakteriophagen

Die Übernachtskulturen der zu untersuchenden *P. aeruginosa* - Stämme wurden 1:1000 auf  $10^5$  bis  $10^6$  CFU/ ml verdünnt. Je 1 ml dieser Verdünnung wurde mit 1 ml der Phagenlysate vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 (beide  $10^7$  PFU/ ml) bzw. 1 ml BHI-Medium als Negativkontrolle vermischt. Die drei Ansätze wurden bei 37 °C aerob bebrütet. Zu definierten Zeitpunkten (0 h, 1,5 h, 6 h, 24 h und 48 h) wurden CFU/ ml (Tropfplattenverfahren) und Phagentiter (Plaque Assay) ermittelt. Zum letzten Zeitpunkt wurden die Überstände aus den Ansätzen mit den Bakteriophagen auf BHI-Platten ausgestrichen und bei 37 °C für 24 h inkubiert, um Einzelkolonien zu picken. Diese wurden im Spot Assay erneut auf ihre Empfänglichkeit gegenüber den Bakteriophagen getestet.

Im weiteren Verlauf wurde zudem ein Phagencocktail aus beiden Phagen im Verhältnis 1:1 ( $10^7$  PFU/ ml) gegen die Negativkontrolle BHI-Medium getestet. Mit diesem Cocktail wurde zusätzlich die Reduktion der Zellzahl bei 12 °C getestet, um den Bedingungen in der Lebensmittelkette näher zu kommen. Aufgrund des langsameren Wachstums wurden zusätzlich die Werte nach 72 h bestimmt.

### 3.2.8. Prävention eines Biofilms

Für die Prävention des Biofilms wurden sechs *P. aeruginosa*-Stämme ausgewählt, die sensibel auf beide Phagen im Spot Assays reagierten, und zwar *P. aeruginosa* ILH 02763, ILH 02678, ILH 02680, ILH 02774, ILH 02778 und ILH 02781. Als Positivkontrolle wurde der *P. aeruginosa*-Stamm DSM 25641 und als Negativkontrolle der gegen beide Phagen resistente Stamm *P. aeruginosa* ILH 02759 mitgeführt. Je 2 ml Flüssigkultur der zu untersuchenden *P. aeruginosa* - Stämme wurden vorbereitet. 30 µl davon wurden in 3 ml MHB<sub>r</sub> 1:100 verdünnt. Die CFU aller Stämme wurde mittels Tropfplattenverfahren bestimmt. Von allen Stämmen wurden je sechsmal 50 µl der verdünnten Lösung ( $10^4$  bis  $10^5$  CFU/ Well) sowie MHB<sub>r</sub> als Negativkontrolle in die Wells zweier 96 - Well - Platten gegeben. Die Wells der ersten Platte wurden mit je 50 µl BHI aufgefüllt, die der zweiten Platte mit je 50 µl Phagencocktail ( $10^6$  PFU/ Well). In die äußeren Wells wurden je 250 µl MHB<sub>r</sub> gegeben, um ein Austrocknen der inneren Wells zu vermeiden. Die Platten wurden abgedeckt bei 37 °C für 20 h bebrütet, bzw. bei 12 °C für 68 h.

Nach der Inkubation bei 37 °C wurde der Überstand aus zwei Wells je Stamm auf BHI-Platten ausgestrichen und bei 37 °C für 24 h inkubiert, um Einzelkolonien zu picken. Diese wurden im Spot Assay erneut auf ihre Empfänglichkeit gegenüber den Bakteriophagen getestet. Der Überstand aller Wells wurde anschließend verworfen und die Wells mit 150 µl PBS gespült. Nachdem sie für zwei Stunden bei 42 °C trocknen gelassen wurden, erfolgte das Einfärben der Biofilme mit je 150 µl einer 0.01 % Crystalviolett - Lösung. Die Platten wurden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend das Crystalviolett abgenommen. Nach einem zweistufigen Waschen mit 400 µl und 150 µl PBS wurden die Platten für eine Stunde bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Im Anschluss wurden je 150 µl 96 %iges Ethanol in die Wells gegeben und die Platten geschlossen für weitere 15 min inkubiert. 100 µl des Inhalts wurden in eine Mikrotiterplatte überführt und die Optische Dichte (OD) bei 595 nm mit dem BioTek EL800 gemessen. Die Negativkontrollen (MHB<sub>r</sub> und BHI resp. MHB<sub>r</sub> und Phagencocktail) wurden als Leerwert von den ermittelten Werten subtrahiert.

### 3.2.9. Bekämpfung eines etablierten Biofilms

Zur Bekämpfung eines bereits etablierten Biofilms wurde mit den *P. aeruginosa* - Stämmen entsprechend der Prävention des Biofilms gearbeitet. Von den zu untersuchenden *P. aeruginosa* - Stämmen wurden je 2 ml einer Flüssigkultur hergestellt. Davon wurden 30 µl abgenommen und in 3 ml MHB<sub>r</sub> 1:100 verdünnt. In zwei 96-Well-Platten wurde pro Stamm sechsmal 100 µl der verdünnten Kultur in die Wells gegeben. Die äußeren Wells wurden mit je 250 µl MHB<sub>r</sub> befüllt, um ein Austrocknen der inneren Wells zu vermeiden. Die Platten wurden abgedeckt bei 37 °C für 20 h oder bei 12 °C für 68 h bebrütet. Die CFU aller eingesetzten Stämme wurde per Tropfplattenverfahren bestimmt. Nach der Inkubation wurde

der Überstand der Wells abgenommen und verworfen. Die Wells wurden anschließend mit 150 µl PBS gewaschen. In die Wells einer Plate wurden je 100 µl einer 1:1 Mischung des Phagencocktails ( $10^7$  CFU/ Well) und MHB<sub>r</sub> gegeben, in die Wells der zweiten Platte je 100 µl einer 1:1 Mischung aus BHI-Medium und MHB<sub>r</sub>. Die Platten wurden zugedeckt bei 37 °C für weitere 6 bzw. 24 h oder bei 12 °C für 24 bzw. 72 h bebrütet. Im Anschluss an die zweite Inkubation bei 37 °C wurde der Überstand aus zwei Wells je Stamm auf BHI-Platten ausgestrichen und bei 37 °C für 24 h inkubiert, um Einzelkolonien zu picken. Diese wurden im Spot Assay erneut auf ihre Empfänglichkeit den Bakteriophagen gegenüber getestet. Der Überstand aller Wells wurde anschließend verworfen und die Platten wie unter 3.2.8. beschrieben gewaschen und in Ethanol gelöst. Im Falle der Bebrütung von sechs Stunden wurden die Platten vor der Zugabe des Crystalviolets über Nacht 17 h bei 42 °C trocknen gelassen, anschließend erfolgte das Waschen ebenfalls wie unter 3.2.8. beschrieben. Die OD der Biofilme wurde bei 595 nm mit dem BioTek EL800 gemessen. Die Negativkontrollen (BHI, Phagencocktail) wurden als Leerwert von den erhaltenen Werten abgezogen.

### 3.2.10. Genomsequenzierung und Bioinformatische Auswertung

Für jeden *P. aeruginosa*-Stamm wurden nach der Durchführung der Spot Assays aus 3.2.6. Klone mit unterschiedlichen Resistenzmustern ausgewählt, um eine Gesamtgenomsequenzierung (NextSeq) durch das BfR durchführen zu lassen. Die Genomassemblierung wurde mithilfe von PATRIC über die Assembly-Strategie „Auto“ durchgeführt. Die Wildstämme und die Klone wurden anschließend mit dem MyDbFinder auf 44 Gene untersucht (siehe Anhang), die häufig Phagenresistenzen bedingen bzw. für eine Phagenbindung essenziell sind (Vaitekenas et al. 2021; Marko et al. 2018; Rocchetta et al. 1999). Als Schwellenwert zur Übereinstimmung der Gene wurden hierfür 60 % festgelegt und als minimale Länge, die das zu untersuchende Gen mit dem Referenzgen abdecken sollte, 40 %.

Anschließend wurde ein tiefergehender Genabgleich der über RAST (RASTtk, automatisch korrigierte Fehler) annotierten Klone in Geneious Prime durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Contigs der Wildstämme über den Punkt „Map to Reference“ der Funktion „Align/Assemble“ („Zuordnung zur Referenz“, „Abgleichen/Zusammensetzen“) mit den über „Group Sequences into a List“ („Sequenzen in einer Liste gruppieren“) zusammengeführten Contigs der Klone abgeglichen. Die so identifizierten identischen Genabschnitte konnten daraufhin auf Deletionen untersucht werden. Fehlten Gene bei mehreren resistenten Klonen verschiedener Wildstämme, wurden die entsprechenden Gene der Wildstämme wie oben beschrieben über den MyDbFinder mit den resistenten und sensiblen Klonen der anderen Stämme abgeglichen. Dies wurde getrennt für resistente Klone gegenüber dem Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 bzw. vB\_Pae-CS2310 durchgeführt.

### 3.2.11. Statistik

Bei den Versuchen zur Zellzahlreduktion sowie zu beiden Biofilm Assays wurden alle Experimente für jeden *P. aeruginosa*-Stamm mindestens dreimal durchgeführt und zur Auswertung der Daten in GraphPad der Median herangezogen.

Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz der Reduktion der Zellzahl durch die einzelnen Phagen vB\_Pae-Tbilisi-M32 und vB\_Pae-CS2310 sowie dem Cocktail in Flüssigmedium wurden die logarithmierten CFU-Daten aller Assays mittels one-way ANOVA in GraphPad analysiert. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz der Reduktion der Biofilme durch den Phagencocktail wurden die OD-Werte aller Biofilm Assays mittels Wilcoxon Test in GraphPad ausgewertet. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der behandelten und nicht behandelten *P. aeruginosa*-Stämme war in beiden Fällen bei einem P-Wert < 0.05 gegeben.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Wirtsspektrum

Der Referenzstamm *P. aeruginosa* DSM 25641 sowie die 14 *P. aeruginosa*-Stämme ILH 02202, ILH 02674, ILH 02676, ILH 02677, ILH 02678, ILH 02680, ILH 02757, ILH 02763, ILH 02774, ILH 02775, ILH 02776, ILH 02781, ILH 02782 und ILH 02786 wurden von den beiden Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 lysiert. Des Weiteren konnten *P. aeruginosa* Stämme detektiert werden, die sich nur gegenüber jeweils einem der Phagen als sensibel erwiesen. Sieben Stämme (ILH 02675, ILH 02777, ILH 02778, ILH 02779, ILH 02780, ILH 02784 und ILH 02755) wurden nur durch den Phagen vB\_Pae-CS2310 lysiert und lediglich ein Stamm, *P. aeruginosa* ILH 02672, war nur sensibel gegenüber dem Phagen vB\_Pae-Tbilisi32. Darüber hinaus erwiesen sich die fünf *P. aeruginosa*-Stämme ILH 02681, ILH 02756, ILH 02759, ILH 02783 und ILH 02785 als resistent gegenüber beiden Phagen.

Insgesamt konnten von den 30 untersuchten *P. aeruginosa* Stämmen 53 % durch den Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und 80 % durch den Phagen vB\_Pae-CS2310 lysiert werden. Durch die Anwendung eines Cocktails aus beiden Phagen konnten 83 % der Stämme lysiert werden und nur 17 % der Stämme erwiesen sich als resistent gegenüber diesem Phagencocktail (Tabelle 7).

Für die weiteren Versuche wurden sechs *P. aeruginosa*-Stämme (ILH 02678, ILH 02680, ILH 02763, ILH 02774, ILH 02778 und ILH 02781) ausgewählt, die sensibel gegenüber beiden Bakteriophagen waren und möglichst aus unterschiedlichen Matrices isoliert wurden. Der gegenüber beiden Phagen resistente Stamm *P. aeruginosa* ILH 02759 wurde als Negativkontrolle und der Referenzstamm *P. aeruginosa* DSM 25641 als Positivkontrolle mitgeführt.

Tabelle 7: Spot Assays zur Bestimmung des Wirtsspektrums der Wildstämme

<i>P. aeruginosa</i> -Stamm	vB_Pa-TbilisiM32	vB_Pae-CS23210	Cocktail
DSM 25641*	+	+	+
ILH 02202	+	+	+
ILH 02672	+	-	+
ILH 02673	-	+	+
ILH 02674	+	+	+
ILH 02675	-	+	+
ILH 02676	+	+	+
ILH 02677	+	+	+
ILH 02678*	+	+	+
ILH 02679	-	+	+
ILH 02680*	+	+	+
ILH 02681	-	-	-
ILH 02755	-	+	+
ILH 02756	-	-	-
ILH 02757	+	+	+
ILH 02759*	-	-	-
ILH 02763*	+	+	+
ILH 02774*	+	+	+
ILH 02775	+	+	+
ILH 02776	-	+	+
ILH 02777	-	+	+
ILH 02778*	+	+	+
ILH 02779	-	+	+
ILH 02780	-	+	+
ILH 02781*	+	+	+
ILH 02782	+	+	+
ILH 02783	-	-	-
ILH 02784	-	+	+
ILH 02785	-	-	-
ILH 02786	+	+	+

+ Lyse; - Resistenz; \*für weitere Untersuchungen ausgewählt

## 4.2. Zellzahlreduktion durch Bakteriophagen

### 4.2.1. Zellzahl

Bei Inkubation bei 37 °C war mit BHI-Medium in allen durchgeführten Experimenten ein ähnliches Wachstum der acht *P. aeruginosa*-Stämme zu beobachten (Abbildung 6). Ausgehend von einer Startkonzentration von 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> CFU/ ml stieg die Zellzahl über 10<sup>7</sup> CFU/ ml nach 6 h bis hin zu einer Endkonzentration von 10<sup>8</sup> bis 10<sup>9</sup> CFU/ ml bei 24 h bzw. 48 h.

Die Zellzahl des Referenzstamms *P. aeruginosa* DSM 25641 wurde durch beide Bakteriophagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 nach einer Inkubationszeit von 1,5 h unter das Detektionslimit von 10<sup>2</sup> CFU/ ml reduziert. Anschließend war ein stetiges Wachstum



zu beobachten, bis hin zu einer Zellzahl von  $2,8 \times 10^9$  CFU/ ml bei Inkubation mit vB\_Pae-TbilisiM32 bzw.  $2,9 \times 10^9$  CFU/ ml bei Inkubation mit vB\_Pa-CS2310. Bei Inkubation mit dem Phagencocktail war die Zellzahl nach 1,5 h und über den gesamten weiteren Zeitraum bis 48 h nicht detektierbar.

Einen ähnlichen Effekt erreichten beide Phagen auch bei Inkubation mit dem Stamm *P. aeruginosa* ILH 02678, bei diesem Stamm waren aufgrund inkonsistenter Werte bei 6 h (vB\_Pae-TbilisiM32) bzw. 24 h (vB\_Pae-CS2310) vier Ansätze durchgeführt worden. Nach 1,5 h war die Zellzahl in beiden Ansätzen auf ein nicht detektierbares Level reduziert. Bei Inkubation mit vB\_Pae-CS2310 war auch nach 6 h keine Detektion der Zellzahl möglich, jedoch konnte nach 24 h und 48 h eine erhöhte Konzentration von  $5,0 \times 10^5$  CFU/ ml bzw.  $4,6 \times 10^7$  CFU/ ml festgestellt werden, die damit geringer war als die der Mediumkontrolle ( $1,5 \times 10^9$  bzw.  $2,4 \times 10^9$  CFU/ ml), jedoch nur bei 24 h statistisch signifikant. Bei Inkubation mit vB\_Pae-TbilisiM32 war hingegen nach 6 h bereits eine Konzentration von  $7,0 \times 10^5$  CFU/ ml erreicht und bei 24 und 48 h mit  $1,5 \times 10^9$  resp.  $2,4 \times 10^9$  CFU/ ml vergleichbare Werte wie die der Mediumkontrolle. Bei Inkubation mit dem Phagencocktail war nach 1,5 h ebenfalls keine Detektion der Zellzahl möglich, aber im Gegensatz zur einzelnen Applikation der Bakteriophagen konnte durch den Einsatz des Phagencocktails über den gesamten Zeitraum von 48 h kein Wachstum ermittelt werden.

Das Wachstum von *P. aeruginosa* ILH 02680 konnte nur durch den Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 reduziert werden. Bereits nach 1,5 h war die Zellzahl nicht mehr detektierbar und auch nach 6 h war diese mit  $1,0 \times 10^2$  CFU/ ml deutlich niedriger als die der Mediumkontrolle ( $7,2 \times 10^7$  CFU/ ml). Nach 24 h bzw. 48 h hatte sich die Zellzahl wieder stark erhöht und lag, ähnlich wie die der Mediumkontrolle, bei etwa  $10^9$  CFU/ ml. Bei Inkubation mit vB\_Pae-CS2310 ließ sich auch 6 h nach Zugabe des Phagen keine Reduktion beobachten, lediglich nach 24 h lag die Konzentration mit  $2,9 \times 10^8$  CFU/ ml eine Log-Stufe unter der der Mediumkontrolle, stieg dann aber innerhalb eines Tages wieder auf  $4,5 \times 10^9$  CFU/ ml an. Der Unterschied war zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant. Bei Inkubation mit dem Phagencocktail war ein ähnlicher Effekt wie nach Inkubation mit dem Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 zu beobachten, mit dem Unterschied, dass nach 6 h die Zellzahl bereits um eine halbe Log-Stufe höher lag.

*P. aeruginosa* ILH 02763 zeigte bei Inkubation mit dem Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 erst nach 6 h eine im Vergleich zur Mediumkontrolle statistisch signifikant um zwei Log-Stufen reduzierte Zellzahl ( $2,2 \times 10^5$  CFU/ ml bzw.  $6,5 \times 10^7$  CFU/ ml). Nach 24 h war die Zelldichte erneut auf dem Niveau der Mediumkontrolle ( $4,3 \times 10^9$  bzw.  $4,0 \times 10^9$  CFU/ ml) und veränderte sich auch nach 48 h nicht erheblich ( $2,1 \times 10^9$  resp.  $2,9 \times 10^9$  CFU/ ml). Durch den Phagen vB\_Pae-CS2310 wurde die Zelldichte des Stamms *P. aeruginosa* ILH 02763 nach 1,5 h auf ein nicht mehr detektierbares Level reduziert und lag auch nach 6 h mit  $2,0 \times 10^2$  CFU/ ml nur knapp darüber.

Nach 24 und 48 h waren wieder Zellzahlen vergleichbar mit denen der Mediumkontrolle erreicht ( $4,5 \times 10^9$  resp.  $1,2 \times 10^9$  CFU/ ml). Bei Inkubation mit dem Phagencocktail erfolgte nach 1,5 h eine Reduktion der Zellzahl auf  $2,1 \times 10^3$  CFU/ ml, welche nach 6 h bereits nicht mehr detektierbar war. Nach 24 h ( $1,0 \times 10^2$  CFU/ ml) und 48 h ( $2,3 \times 10^7$  CFU/ ml) lag die Zellzahl noch immer unter dem Wert der Mediumkontrolle, bei 48 h war dieser Unterschied jedoch nicht mehr statistisch signifikant.

Die Zellzahl von *P. aeruginosa* ILH 02774 war bei Inkubation mit dem Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 bereits nach 1,5 h nicht mehr detektierbar und blieb auch nach 6 h mit  $9,0 \times 10^2$  CFU/ ml deutlich unter der der Mediumkontrolle ( $8,7 \times 10^7$  CFU/ ml). Bei den Zeitwerten 24 h und 48 h waren die Werte auf das gleiche Niveau wie die der Mediumkontrolle angestiegen und lagen bei etwa  $10^9$  CFU/ ml. Durch den Phagen vB\_Pae-CS2310 wurde die Zellzahl nach 1,5 h auf  $2,0 \times 10^2$  CFU/ ml reduziert und blieb auch nach 6 h auf einem ähnlichen Level ( $1,0 \times 10^2$  CFU/ ml). Nach 24 h lag die Zellzahl noch immer leicht, aber statistisch signifikant unter der der Mediumkontrolle ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ ml), erreichte nach 48 h jedoch wieder einen vergleichbaren Wert ( $1,9 \times 10^9$  CFU/ ml). Bei Inkubation mit dem Phagencocktail war die Zellzahl sowohl nach 1,5 h als auch nach 6 h nicht mehr detektierbar. Nach 24 h bzw. und 48 h erreichte die Zelldichte wieder Werte um  $10^9$  CFU/ ml und war damit auf dem Niveau der Mediumkontrolle.

*P. aeruginosa* ILH 02778 zeigte bei Inkubation mit dem Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 nach 1,5 h im Vergleich zur Mediumkontrolle eine Reduktion der Zellzahl um eine Log-Stufe auf  $3,0 \times 10^4$  CFU/ ml. Nach 6 h reduzierte sich diese weiter auf  $9,0 \times 10^2$  CFU/ ml. Jedoch stieg die Zellzahl nach 24 h bzw. 48 h wieder an und erreichte Werte vergleichbar mit denen der Mediumkontrolle. Bei Inkubation mit dem Phagen vB\_Pae-CS2310 war die Zellzahl nach 1,5 h ebenfalls um eine Log-Stufe auf  $6,8 \times 10^4$  CFU/ ml reduziert (statistisch nicht signifikant) und blieb auch nach 6 h auf diesem Niveau (statistisch signifikant). Nach 24 h war die Zelldichte mit  $3,4 \times 10^7$  CFU/ ml noch immer statistisch signifikant geringer als die der Mediumkontrolle, erhöhte sich nach 48 h aber noch einmal um eine Log-Stufe und war damit identisch mit der Zelldichte der Mediumkontrolle von  $4,2 \times 10^8$  CFU/ ml. Analog dazu wurde die Zelldichte des Stamms *P. aeruginosa* ILH 02778 durch den Phagencocktail nach 1,5 h auf  $4,8 \times 10^4$  CFU/ ml reduziert und blieb auch nach 6 h bei einer vergleichbaren Konzentration. Das Wachstum lief anschließend verzögert ab, bis nach 24 h eine Zelldichte von  $1,1 \times 10^7$  CFU/ ml und nach 48 h schließlich eine mit der Mediumkontrolle vergleichbare Zelldichte von  $4,3 \times 10^8$  CFU/ ml erreicht wurde.

Die Zelldichte von *P. aeruginosa* ILH 02781 wies bei 6 h inkonsistente Werte auf und der Ansatz wurde deshalb ein viertes Mal durchgeführt. Die Zellzahl konnte dabei durch beide Phagen nach 1,5 h auf ein nicht detektierbares Level gesenkt werden. Nach 6 h waren wieder geringe Zellzahlen detektierbar, die sowohl im Ansatz mit vB\_Pae-TbilisiM32

( $8,0 \times 10^2$  CFU/ ml), als auch im Ansatz mit vB\_Pae-CS2310 ( $5,1 \times 10^1$  CFU/ ml) deutlich unter der der Mediumkontrolle ( $4,8 \times 10^7$  CFU/ ml) lagen. Bei Inkubation mit vB\_Pae-TbilisiM32 stieg die Zelldichte nach 24 h bzw. 48 h auf bis zu  $10^9$  CFU/ ml an und war damit auf dem gleichen Niveau wie die der Mediumkontrolle. Im Ansatz mit vB\_Pae-CS2310 war die Zelldichte mit  $2,0 \times 10^8$  CFU/ ml nach 24 h noch statistisch signifikant geringer als die der Mediumkontrolle, erreichte nach 48 h aber einen vergleichbaren Wert von  $1,8 \times 10^9$  CFU/ ml. Bei Inkubation mit dem Phagencocktail lag die Zellzahl nach 1,5 h sowie nach 6 h unter dem Detektionslimit und auch nach 24 h war die Zelldichte mit  $1,3 \times 10^7$  CFU/ ml weiterhin statistisch signifikant geringer als die der Mediumkontrolle. Nach 48 h war hingegen eine vergleichbare Konzentration von  $1,5 \times 10^9$  CFU/ ml erreicht.

Der als Negativkontrolle eingesetzte Stamm *P. aeruginosa* ILH 02759 wurde weder durch einen der einzelnen Phagen noch durch den Phagencocktail beeinflusst und wies bei allen ermittelten Zeitpunkten Konzentrationen wie die der Mediumkontrolle auf.

Bei 12 °C verlief das Wachstum in BHI-Medium bei allen acht Stämmen ähnlich, jedoch langsamer als bei 37 °C. Ausgehend von einer Startkonzentration von  $10^5$  bis  $10^6$  CFU/ ml stieg die Zellzahl über die ersten 24 h kaum oder nicht an und erreichte erst nach 72 h eine Zellzahl von maximal  $10^8$  CFU/ ml (Abbildung 7).

Beim Referenzstamm *P. aeruginosa* DSM 25641 konnte bereits nach 1,5 h Inkubation mit dem Phagencocktail eine statistisch signifikante Reduktion der Zellzahl um eine Logstufe auf  $1,8 \times 10^5$  CFU/ ml beobachtet werden. Nach 6 h war die Zellzahl bereits nicht mehr detektierbar und blieb dies auch über den gesamten weiteren Zeitraum bis 72 h.

Der *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02678 war nach 1,5 h nicht mehr detektierbar und blieb auch über den gesamten Zeitraum von 72 h auf diesem nicht detektierbaren Niveau.

Die Zellzahl des *P. aeruginosa*-Stamms ILH 02680 blieb bei Inkubation mit dem Phagencocktail und der Mediumkontrolle über die ersten 6 h auf einem vergleichbaren Level von  $10^5$  CFU/ ml. Auch nach 24 und 48 h war bei Inkubation mit dem Phagencocktail nur ein geringes Wachstum zu beobachten ( $1,6 \times 10^5$  bzw.  $4,5 \times 10^5$  CFU/ ml), während die Zellzahl der Mediumkontrolle über  $1,8 \times 10^6$  CFU/ ml auf  $1,3 \times 10^7$  CFU/ ml anstieg, was einen statistisch signifikanten Unterschied darstellte. Erst nach 72 h erreichte die Zelldichte bei Inkubation mit dem Phagencocktail  $3,1 \times 10^6$  CFU/ ml und lag damit weiterhin unter der der Mediumkontrolle ( $1,2 \times 10^8$  CFU/ ml).

Der *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02763 wurde durch den Phagencocktail über die 72 h kontinuierlich von  $1,8 \times 10^6$  CFU/ ml um drei Logstufen auf  $3,2 \times 10^3$  CFU/ ml reduziert. Die Zellzahl bei Inkubation mit Mediumkontrolle hingegen stieg von  $1,9 \times 10^6$  CFU/ ml stetig bis auf  $1,3 \times 10^8$  CFU/ ml nach 72 h an. Die Differenzen waren bereits nach 1,5 h und über den gesamten Zeitraum als statistisch signifikant zu betrachten.

Im Fall von *P. aeruginosa* ILH 02774 wurde durch Inkubation mit dem Phagenscocktail die Zellzahl nach 1,5 h auf ein nicht detektierbares Level gesenkt und war auch nach 24 h nicht erneut detektierbar. Erst nach 48 h konnte eine Zellzahl von  $3,6 \times 10^5$  CFU/ ml ermittelt werden, die aber noch immer unter der der Mediumkontrolle von  $2,7 \times 10^7$  CFU/ ml lag. Auch nach 72 h lag die Zellzahl bei Inkubation mit dem Cocktail mit  $1,3 \times 10^7$  CFU/ ml weiterhin statistisch signifikant unter der Zellzahl der Mediumkontrolle ( $2,0 \times 10^8$  CFU/ ml).

Bei dem *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02778 blieb die Zellzahl über die ersten 24 h in beiden Ansätzen unverändert bei  $10^5$  CFU/ ml. Nach 48 h und 72 h war die Zellzahl bei Inkubation mit dem Cocktail auf  $4,0 \times 10^4$  CFU/ ml bzw.  $7,8 \times 10^4$  CFU/ ml reduziert, wohingegen sie bei Inkubation mit der Mediumkontrolle auf  $1,2 \times 10^6$  CFU/ ml bzw.  $5,6 \times 10^6$  CFU/ ml angestiegen war. Damit lag die Zellzahl von *P. aeruginosa* ILH 02778 ab dem ermittelten Zeitpunkt von 24 h statistisch signifikant unter der der Mediumkontrolle.

Der *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02781 wurde durch den Phagenscocktail nach 1,5 h auf ein nicht detektierbares Level reduziert und die Zellzahl stieg auch über den restlichen Zeitraum bis einschließlich 72 h nicht mehr an.

Bei der Negativkontrolle *P. aeruginosa* ILH 02759 war kein Unterschied der Zellzahl bei Inkubation mit oder ohne Phagenscocktail ermittelbar. Die Zellzahl blieb über die ersten 24 h bei  $10^5$  CFU/ ml und erhöhte sich nach 48 h auf  $10^6$  CFU/ ml. Nach 72 h erreichten beide Ansätze ihr Maximum von  $10^8$  CFU/ ml.

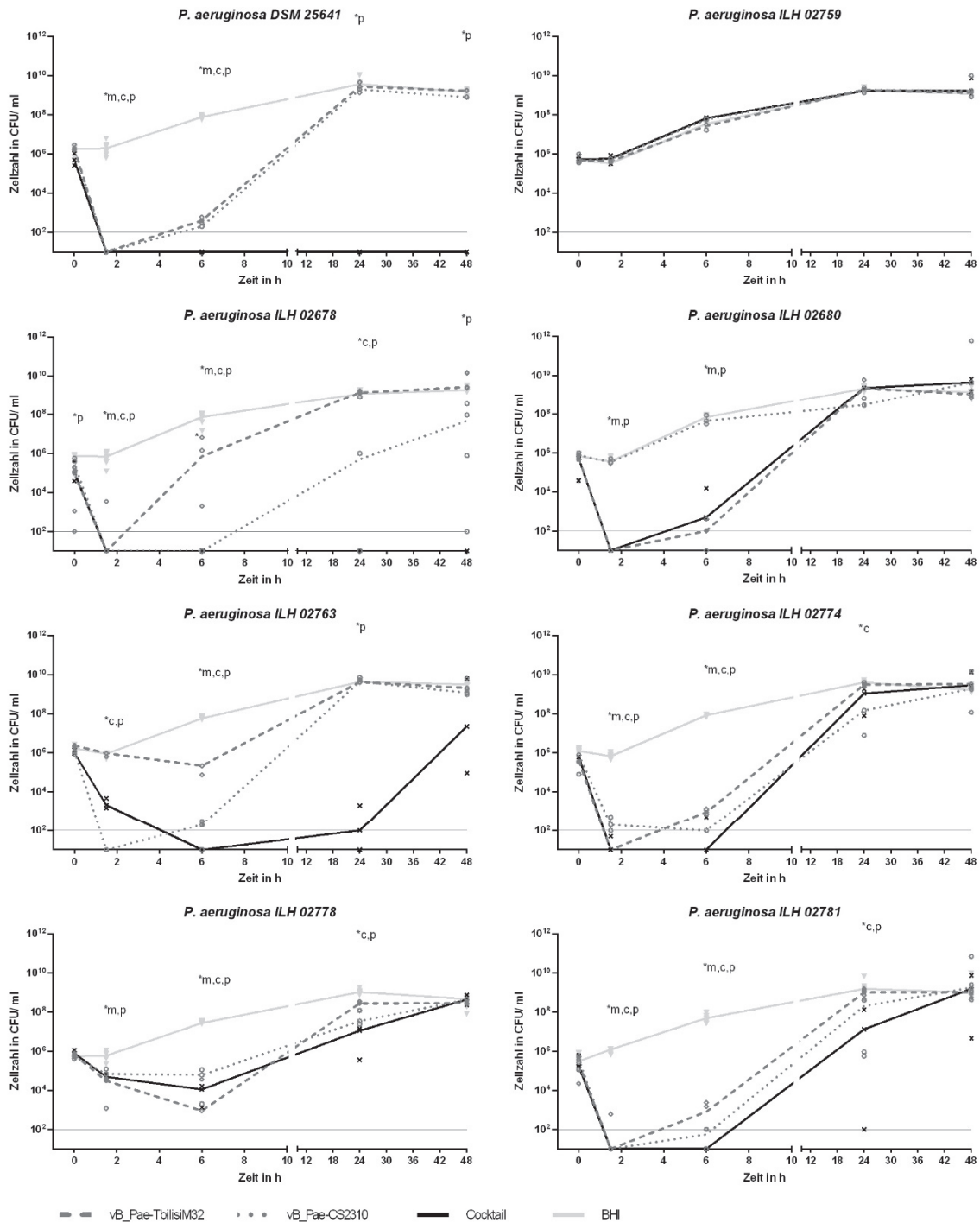


Abbildung 6: Zellzahlreduktion durch Bakteriophagen bei 37 °C

Acht *P. aeruginosa*-Stämme wurden in BHI bei 37 °C sowohl mit den einzelnen Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 als auch mit einem Cocktail aus beiden inkubiert. Die entsprechenden Zellzahlen wurden zu fünf verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 1,5 h, 6 h, 24 h, 48 h) bestimmt. Dargestellt sind die einzelnen Werte und der Median.

\*m: Reduktion durch vB\_Pae-TbilisiM32 statistisch signifikant mit p-Wert < 0,05; \*c: Reduktion durch vB\_Pae-CS2310 statistisch signifikant mit p-Wert < 0,05; \*p: Reduktion durch Phagencocktail statistisch signifikant mit p-Wert < 0,05

# Ergebnisse

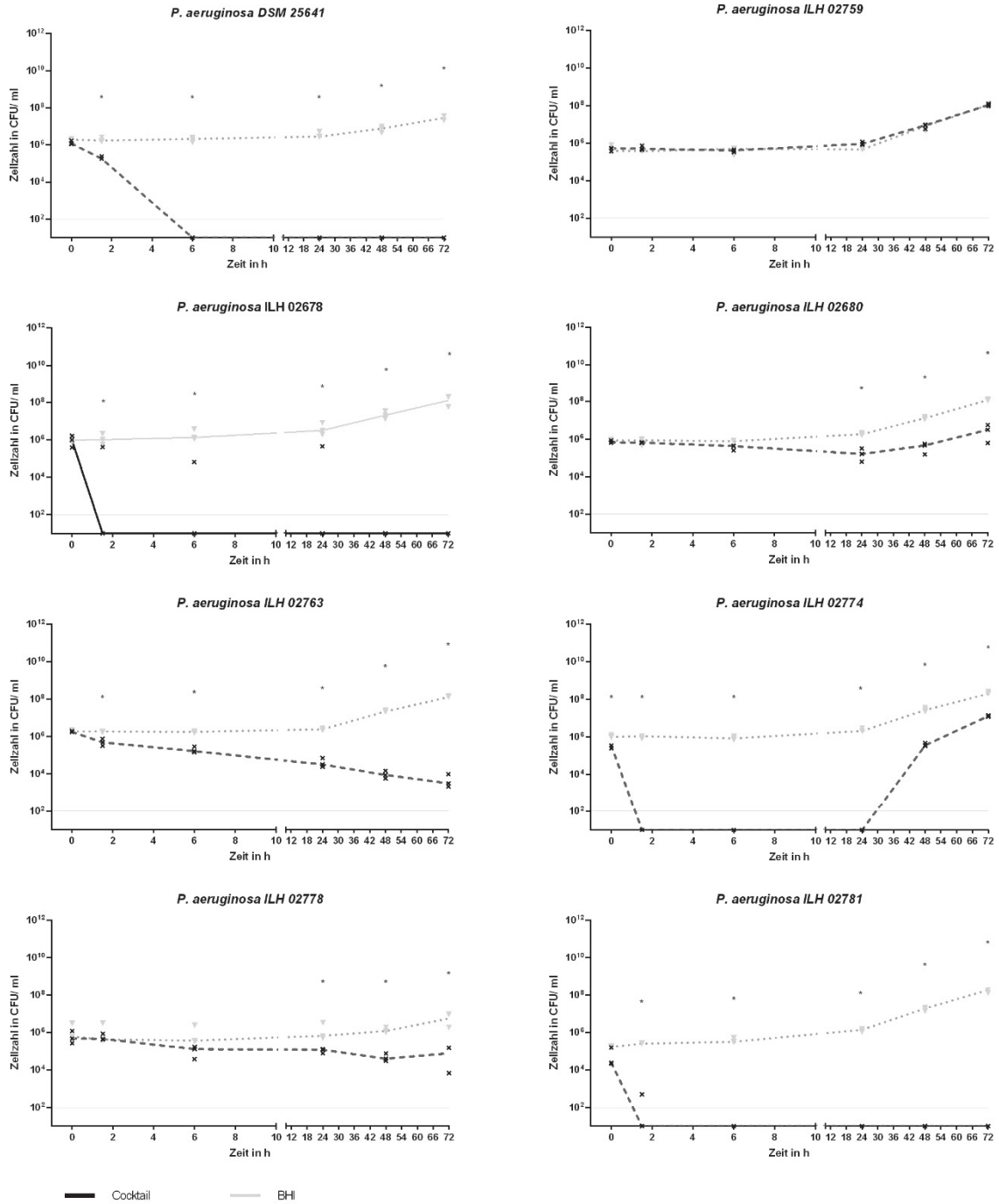


Abbildung 7: Zellzahlreduktion durch Bakteriophagen bei 12 °C

Acht *P. aeruginosa*-Stämme wurden in BHI bei 12 °C mit einem Cocktail aus den beiden Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 inkubiert. Die Zellzahlen wurden zu sechs verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 1,5 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h) bestimmt. Dargestellt sind die einzelnen Werte und der Median.

\*: Reduktion durch den Phagencocktail statistisch signifikant mit p-Wert < 0,05

#### 4.2.2. Phagentiter

Zur Untersuchung der Wechselwirkung von Bakteriophagen und *P. aeruginosa* wurde zu allen Zeitpunkten zusätzlich zur Zellzahl auch der Phagentiter bestimmt. Bei Inkubation bei 37 °C stieg der Titer des Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 bei vier der insgesamt acht untersuchten Stämme über den Zeitraum von 48 h an (Abbildung 8). Bei den Stämmen *P. aeruginosa* ILH 02678, ILH 02778 und ILH 02781 erhöhte sich dieser um zwei Log-Stufen von  $10^7$  PFU/ ml auf  $10^9$  PFU/ ml, während bei dem Stämmen ILH DSM 25641 eine Erhöhung um nur eine Log-Stufe von  $10^7$  PFU/ ml auf  $10^8$  PFU/ ml erkennbar war. Bei den *P. aeruginosa* Stämmen ILH 02759, ILH 02680, ILH 02763 und ILH 02774 blieb der Phagentiter über den gesamten Zeitraum von 48 h unverändert bei etwa  $10^7$  PFU/ ml.

Während der Titer des Phagen vB\_Pae-CS2310 bei den drei *P. aeruginosa* Stämmen ILH 02759, ILH 02680 und ILH 02763 über den Zeitraum von 48 h unverändert bei  $10^7$  PFU/ ml blieb, stieg er bei den Stämmen DSM 25641, ILH 0267 und ILH 02781 um eine halbe Log-Stufe von  $2 \times 10^7$  PFU/ ml auf  $7 \times 10^7$  PFU/ ml an. Bei Inkubation mit *P. aeruginosa* ILH 02778 war in demselben Zeitraum ein Anstieg um eine Log-Stufe von  $10^7$  PFU/ ml auf  $10^8$  PFU/ ml zu erkennen, wohingegen bei Inkubation mit *P. aeruginosa* 02774 eine Reduktion um eine Log-Stufe von  $10^7$  PFU/ ml auf  $10^6$  PFU/ ml zu beobachten war.

Bei Inkubation mit dem Phagencocktail blieb die Konzentration des Cocktails bei den fünf *P. aeruginosa* Stämmen DSM 25641, ILH 02759, ILH 02678, ILH 02680 und ILH 02763 über den Zeitraum von 48 h unverändert bei  $10^7$  PFU/ ml. Bei den Stämmen ILH 02774 und ILH 02778 stieg der Titer des Phagencocktails hingegen um eine Log-Stufe von  $10^7$  PFU/ ml auf  $10^8$  PFU/ ml und bei ILH 02871 war sogar ein Anstieg um zwei Log-Stufen auf  $10^9$  PFU/ ml zu sehen.

Bei den Ansätzen, die bei 12 °C durchgeführt wurden, lag der Phagentiter bei allen acht *P. aeruginosa*-Stämmen über den gesamten Zeitraum von 72 h bei  $10^7$  PFU/ ml (Abbildung 9).

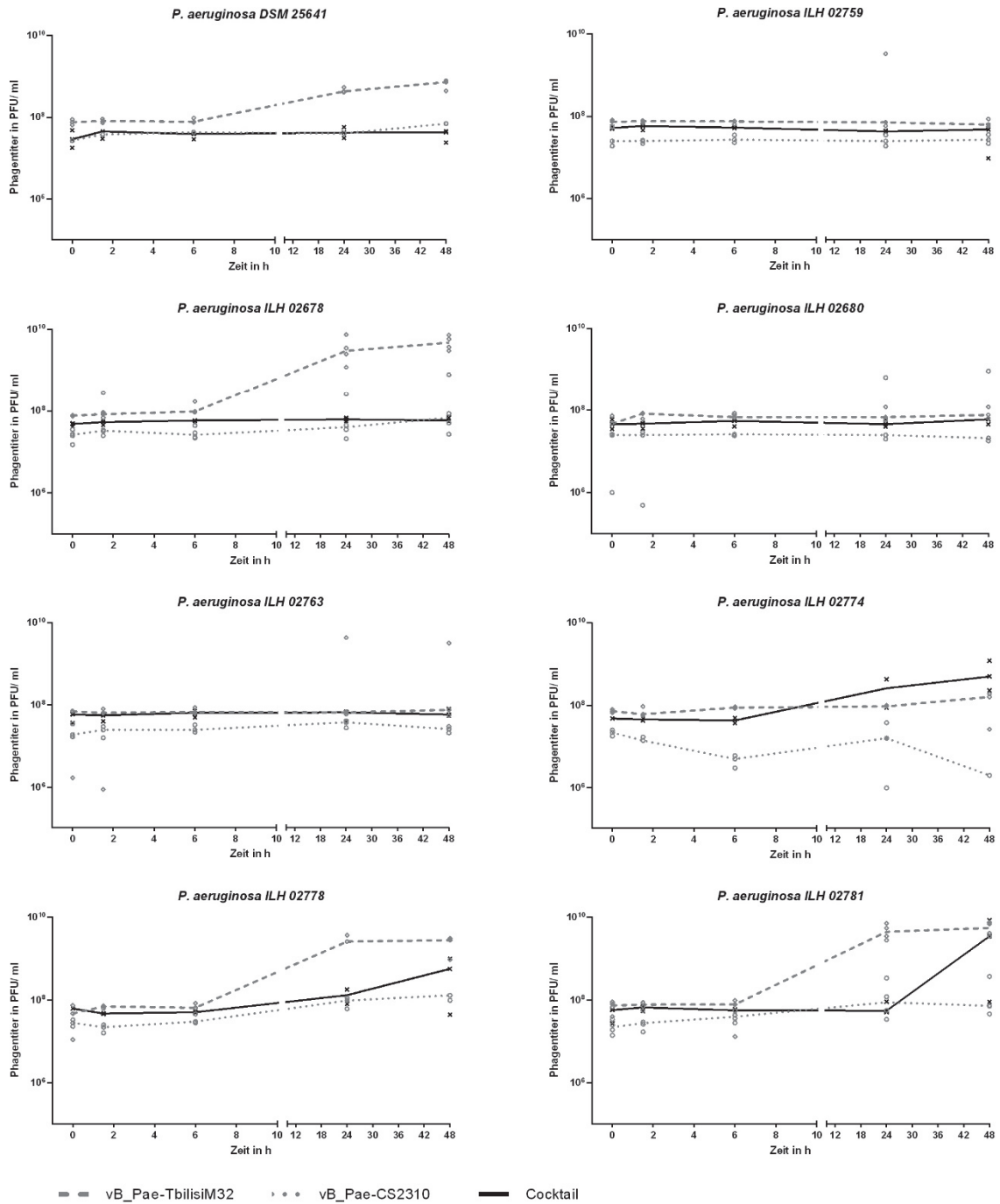


Abbildung 8: Phagentiter bei 37 °C

Acht *P. aeruginosa*-Stämme wurden in BHI bei 37 °C sowohl mit den einzelnen Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 als auch mit einem Cocktail aus beiden inkubiert. Zu fünf verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 1,5 h, 6 h, 24 h, 48 h) wurden die entsprechenden Phagentiter bestimmt. Dargestellt sind die einzelnen Werte und der Median.



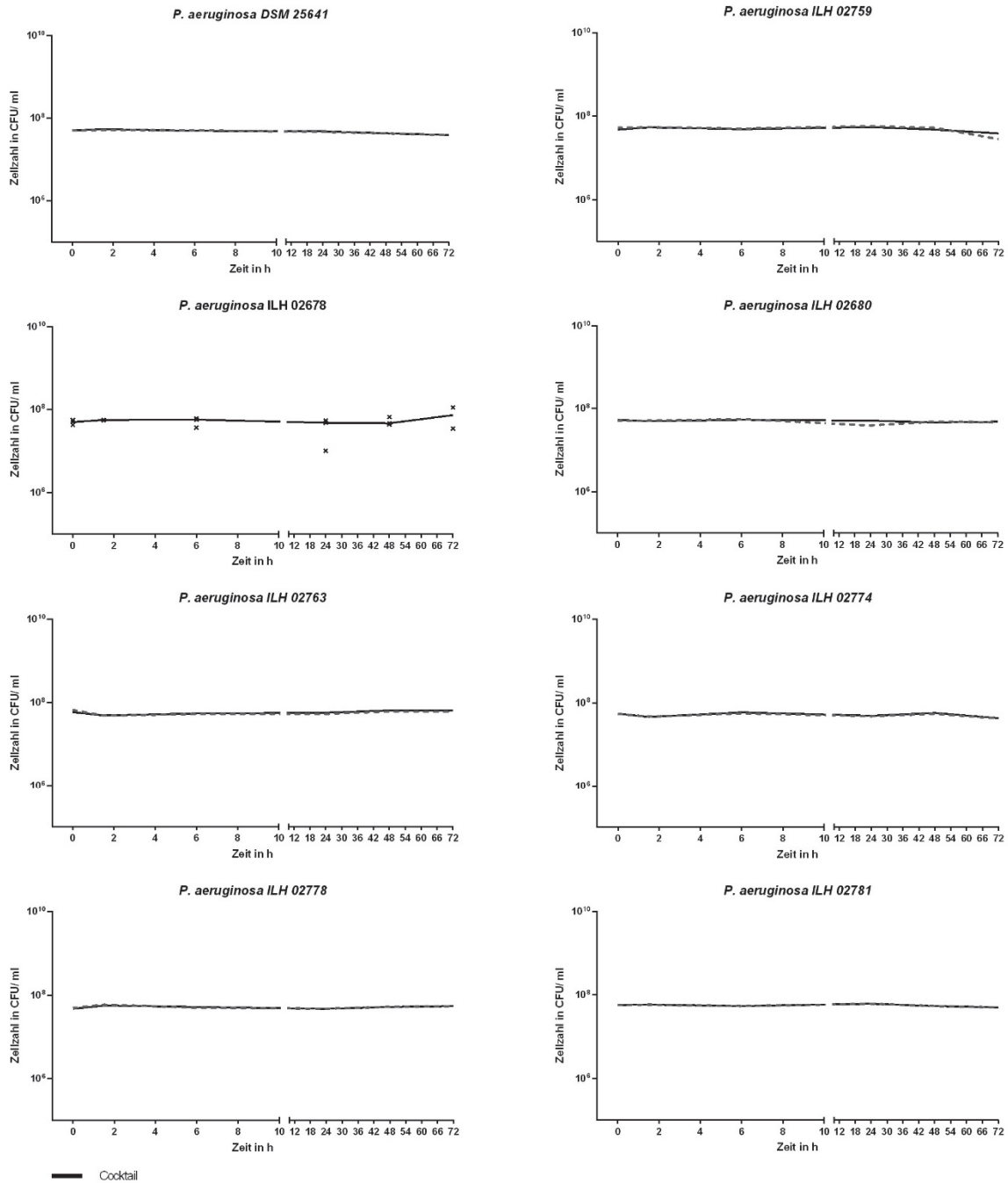


Abbildung 9: Phagentiter bei 12 °C

Acht *P. aeruginosa*-Stämme wurden in BHI bei 12 °C mit einem Cocktail aus den beiden Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 inkubiert. Die Zellzahlen wurden zu sechs verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 1,5 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h) bestimmt. Dargestellt sind die einzelnen Werte und der Median.

#### 4.2.3. Resistente Klone nach Inkubation

Um eine bakterielle Resistenzentwicklung nachvollziehen zu können, wurden nach 48 h Inkubation bei 37 °C aus allen Ansätzen mit den einzeln applizierten Phagen für alle acht Stämme je 10 Klone (n=30) gewonnen und erneut in Spot Assays auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den einzelnen Phagen sowie dem Cocktail überprüft (Tabelle 8 und Tabelle 9).

Alle gewonnenen Klone der beiden *P. aeruginosa*-Stämme DSM 25641 (30 Klone) und ILH 02781 (40 Klone) waren auch nach Inkubation mit vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 noch durch den Cocktail sowie beide einzelnen Phagen lysierbar.

Von dem *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02678 waren nach Inkubation mit vB\_Pae-TbilisiM32 ebenfalls alle 40 Klone sensibel gegenüber dem Cocktail sowie den einzelnen Phagen. Nach Inkubation mit vB\_Pae-CS2310 konnten nur 20 Klone gewonnen werden, die alle sensibel gegenüber dem Phagencocktail waren. 16 dieser Klone (80 %) waren ebenfalls sensibel gegen beide Phagen, vier Klone entwickelten jedoch eine Resistenz gegen vB\_Pae-CS2310. Alle 30 Klone des *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02680 entwickelte nach Inkubation mit vB\_Pae-TbilisiM32 Resistenzen gegen den Cocktail und beide einzeln applizierten Phagen. Nach Inkubation mit dem Phagen vB\_Pae-CS2310 konnten alle 30 Klone durch den Cocktail lysiert werden, davon waren 9 (30 %) auch sensibel gegen die einzeln applizierten Phagen, 11 Klone (37 %) entwickelten jedoch eine Resistenz gegen vB\_Pae-CS2310 und 10 Klone (33%) gegenüber vB\_Pae-TbilisiM32.

Von den 30 Klonen des *P. aeruginosa*-Stamms ILH 02763 entwickelte einer (3 %) bei Inkubation mit vB\_Pae-TbilisiM32 eine Resistenz gegen den Cocktail und beide einzeln applizierten Phagen. Die restlichen Klone waren alle sensibel gegenüber dem Cocktail und 27 davon (90 %) auch gegenüber beiden einzeln applizierten Phagen. 2 Klone (7 %) entwickelten hingegen eine Resistenz gegenüber vB\_Pae-TbilisiM32. Bei Inkubation mit vB\_Pae-CS2310 entwickelten zwei Klone (7 %) eine Resistenz gegen den Cocktail und vB\_Pae-CS2310. Die restlichen 28 Klone waren sensibel gegenüber dem Cocktail, davon 12 (40 %) auch gegenüber den einzeln applizierten Phagen und 16 Klone (53 %) entwickelten eine Resistenz gegen vB\_Pae-CS2310.

Alle 30 Klone des *P. aeruginosa*-Stamms ILH 02774 waren nach Inkubation mit vB\_Pae-TbilisiM32 weiterhin sensibel gegenüber dem Phagencocktail, davon 23 (77 %) auch gegenüber beiden einzeln applizierten Phagen. 6 Klone (20 %) entwickelten hingegen eine Resistenz gegen vB\_Pae-TbilisiM32 und einer gegen vB\_Pae-CS2310. Auch bei Inkubation mit vB\_Pae-CS2310 waren alle 30 Klone sensibel gegenüber dem Cocktail, wovon 24 Klone (80 %) keine Resistenzen und 6 Klone eine Resistenz nur gegen vB\_Pae-CS2310 entwickelten.

Bei Inkubation mit vB\_Pae-TbilisiM32 entwickelte ein Klon (3 %) des *P. aeruginosa*-Stamms ILH 02778 eine Resistenz gegenüber dem Cocktail und auch beiden einzeln applizierten

Phagen. Die restlichen 29 Klone waren zwar resistent gegen den Phagen vB\_Pae-TbilisiM32, wurden aber weiterhin durch den Cocktail lysiert. Bei Inkubation mit dem Phagen vB\_Pae-CS2310 wurden alle 30 Klone durch den Phagencocktail lysiert, davon 20 (67 %) auch durch die einzeln applizierten Phagen und 10 Klone entwickelten eine Resistenz nur gegen vB\_Pae-TbilisiM32.

Alle 30 Klone des *P. aeruginosa*-Stamms ILH 02759 waren nach Inkubation mit beiden Phagen weiterhin gegen diese und den Cocktail resistent.

Tabelle 8: Spot Assays zur Feststellung einer Resistenzentwicklung nach Inkubation mit vB\_Pae-TbilisiM32

Stamm (n)	sensibel gegenüber Cocktail				resistent gegenüber Cocktail			
	+/+	+/-	-/+	-/-	+/+	+/-	-/+	-/-
ILH 02678 (40)	40	0	0	0	0	0	0	0
ILH 02680 (30)	0	0	0	0	0	0	0	30
ILH 02763 (30)	27	0	2	0	0	0	0	1
ILH 02774 (30)	23	1	6	0	0	0	0	0
ILH 02778 (30)	0	0	29	0	0	0	0	1
ILH 02781 (40)	40	0	0	0	0	0	0	0
DSM 25641 (30)	30	0	0	0	0	0	0	0

+/+ Lyse durch beide Phagen; +/- Lyse durch vB\_Pae-TbilisiM32; -/+ Lyse durch vB\_Pae-CS2310; -/- Lyse durch keinen der beiden Phagen

Tabelle 9: Spot Assays zur Feststellung einer Resistenzentwicklung nach Inkubation mit vB\_Pae-CS2310

Stamm (n)	sensibel gegenüber Cocktail				resistent gegenüber Cocktail			
	+/+	+/-	-/+	-/-	+/+	+/-	-/+	-/-
ILH 02678 (20)	16	4	0	0	0	0	0	0
ILH 02680 (30)	9	11	10	0	0	0	0	0
ILH 02763 (30)	12	16	0	0	0	2	0	0
ILH 02774 (30)	24	6	0	0	0	0	0	0
ILH 02778 (30)	20	0	10	0	0	0	0	0
ILH 02781 (40)	40	0	0	0	0	0	0	0
DSM 25641 (30)	30	0	0	0	0	0	0	0

+/+ Lyse durch beide Phagen; +/- Lyse durch vB\_Pae-TbilisiM32; -/+ Lyse durch vB\_Pae-CS2310; -/- Lyse durch keinen der beiden Phagen

### 4.3. Prävention eines Biofilms

#### 4.3.1. Biofilm Assay

Für einen Überblick sollten zunächst sechs gegenüber den beiden Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 sensible *P. aeruginosa*-Stämme sowie eine Positiv- und Negativkontrolle darauf getestet werden, ob bei Zugabe eines Cocktails beider Phagen einer Biofilmbildung vorgebeugt werden kann. Bei Inkubation mit BHI-Medium bei 37 °C bildeten alle der acht getesteten *P. aeruginosa*-Stämme eindeutige starke Biofilme mit OD-Werten zwischen 1,2 und 8,7 aus (Abbildung 10).

Neben dem als Positivkontrolle eingesetzten sensiblen *P. aeruginosa*-Stamm DSM 25641 konnte die Biofilmbildung von vier der sechs getesteten Stämme (66,6 %) durch Inkubation mit dem Phagencocktail stark eingeschränkt werden. Die OD bei diesen Stämmen lag bei null oder leicht darüber, im Fall von *P. aeruginosa* DSM 25641 sowie *P. aeruginosa* ILH 02678 entsprach das einer Reduktion um 99 %, bei *P. aeruginosa* ILH 02774 um 98 % und bei *P. aeruginosa* ILH 02781 um 97 %.

Bei der Negativkontrolle *P. aeruginosa* ILH 02759 und bei den zwei weiteren Stämmen *P. aeruginosa* ILH 02763 und ILH 02778 waren die Biofilmmassen nach Inkubation mit dem Phagencocktail vergleichbar mit denen ohne, mit statistisch nicht signifikanten Abweichungen von lediglich 5-10 %.

Das Biofilm Assay musste für den Stamm *P. aeruginosa* ILH 02680 aufgrund inkonsistenter Ergebnisse viermal durchgeführt werden, in zwei der Wiederholungen war eine um 98 % reduzierte Biofilmbildung durch den Phagencocktail zu beobachten, wohingegen in den anderen zwei Durchläufen eine leichte Steigerung um 37 % feststellbar war. Betrachtet man den Median der Biofilmmasse aus allen vier Experimenten, folgt eine Reduktion um 29 % durch Inkubation mit dem Phagencocktail.

Bei Inkubation mit BHI-Medium bei 12 °C bildeten alle acht *P. aeruginosa*-Stämme erkennbare Biofilme aus, die jedoch deutlich unter der Biofilmmasse bei 37 °C lagen (Abbildung 11). Es konnte dennoch bei allen Stämmen eine Reduktion der Biofilmmasse nachgewiesen werden, lediglich die der Negativkontrolle *P. aeruginosa* ILH 02759 war bei Inkubation mit dem Phagencocktail um 38 % erhöht (statistisch nicht signifikant). Neben der Positivkontrolle *P. aeruginosa* DSM 25641 mit einer Reduktion der Biofilmmasse um 98 % waren auch die Reduktionen der Biofilmmassen der *P. aeruginosa*-Stämme ILH 02678, ILH 02774, ILH 02763 und ILH 02781 stark ausgeprägt (85 %, 93 %, 95 % und 99 %). Der *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02778 zeigte eine etwas geringere Reduktion der Biofilmmasse um 68 %, ebenfalls war der *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02680 um 42 % reduziert, was jedoch statistisch nicht signifikant war.

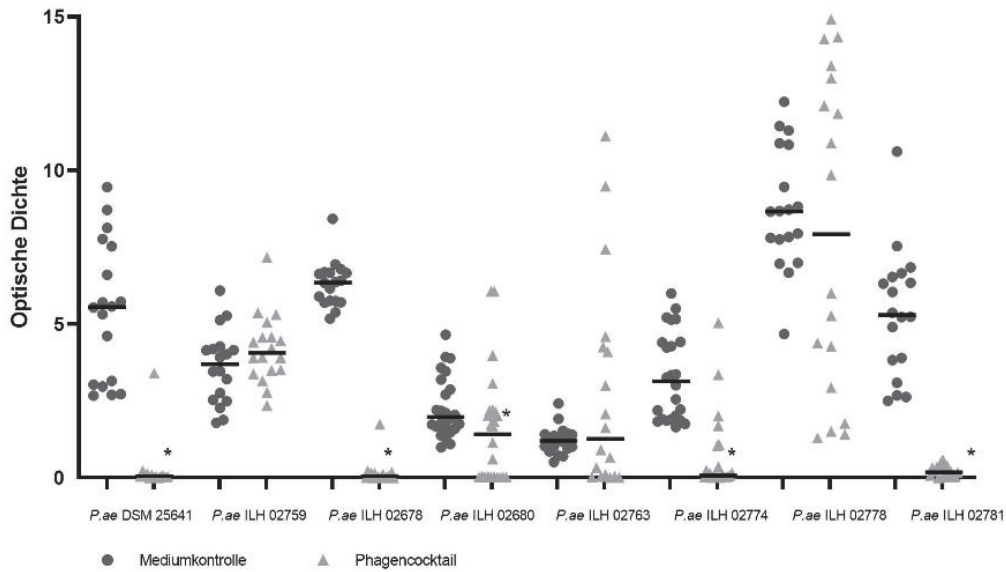


Abbildung 10: Prävention eines Biofilms bei 37 °C

Acht *P. aeruginosa*-Stämme wurden mit einem Phagenscocktail aus den beiden Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 bei 37 °C inkubiert. Dargestellt sind die einzelnen Werte der ermittelten Biofilmmassen (OD) sowie der daraus errechnete Median.

\*: Reduktion durch den Phagenscocktail statistisch signifikant mit p-Wert < 0,05

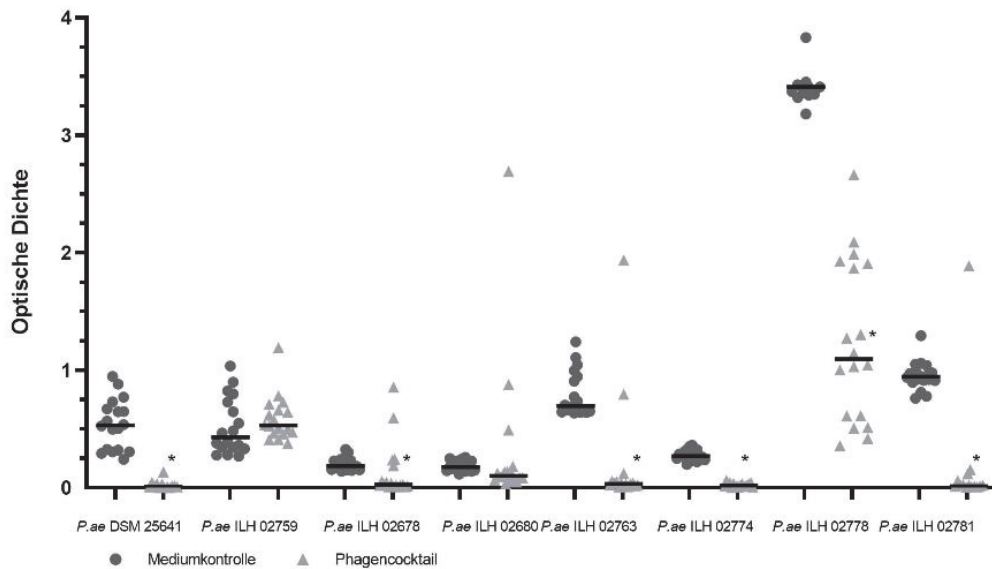


Abbildung 11: Prävention eines Biofilms bei 12 °C

Acht *P. aeruginosa*-Stämme wurden mit einem Phagenscocktail aus den beiden Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 bei 12 °C inkubiert. Dargestellt sind die einzelnen Werte der ermittelten Biofilmmassen (OD) sowie der daraus errechnete Median.

\*: Reduktion durch den Phagenscocktail statistisch signifikant mit p-Wert < 0,05

#### 4.3.2. Resistente Klone nach Inkubation

Um eine mögliche Resistenzentwicklung nach Inkubation mit dem Phagencocktail zu identifizieren, wurden aus zwei Wells pro Stamm und Ansatz bei 37 °C jeweils 10 Klone gewonnen (n=60) und erneut in einem Spot Assay auf ihre Empfindlichkeit gegen die Bakteriophagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 sowie den Cocktail aus beiden Phagen getestet (Tabelle 10). Zwei der Stämme, *P. aeruginosa* DSM 25641 und *P. aeruginosa* ILH 02678, waren nach Inkubation mit dem Phagencocktail nicht mehr anzüchtbar, weshalb keine Spot Assays durchgeführt werden konnten.

Der Stamm *P. aeruginosa* ILH 02774 zeigte nur in drei der sechs ausgetrichenen Well-Überständen Wachstum mit teilweise sehr wenigen Kolonien. Deshalb wurde der Versuch für diesen Stamm ein viertes Mal durchgeführt. Insgesamt konnten 50 Klone untersucht werden und 42 % davon erwiesen sich als resistent gegenüber dem Phagencocktail. Drei davon waren nur durch den Phagen vB\_Pae-CS2310 lysiert worden und 18 durch beide einzelnen Phagen. 18 % aller Klone waren sowohl gegenüber dem Cocktail als auch gegenüber beiden einzelnen Phagen sensibel. Weitere 38 % waren gegen den Cocktail und den Phagen vB\_Pae-CS2310 empfänglich, jedoch resistent gegen vB\_Pae-TbilisiM32. Ein Klon war nur gegen den Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 sensibel, wurde aber durch den Cocktail trotzdem lysiert.

Auch der Stamm *P. aeruginosa* ILH 02680 wurde ein viertes Mal getestet, da in den vorherigen Ansätzen in nur vier der sechs Ausstriche Einzelkolonien gewonnen werden konnten. Von den anschließend 60 durchgeführten Spot Assays wurden 83 % der Klone nicht durch den Phagencocktail lysiert. Davon waren 46 Klone (76 %) auch resistent gegen beide einzeln applizierten Phagen. Vier weitere Klone (7 %) waren jedoch weiterhin gegenüber dem Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 empfänglich. Die 10 durch den Cocktail lysierten Klone erwiesen sich alle als ebenfalls sensibel gegenüber den beiden einzelnen Phagen.

Für den Stamm *P. aeruginosa* ILH 02763 konnte lediglich bei 12 % der getesteten 60 Klone eine Resistenz gegenüber dem Phagencocktail festgestellt werden. Sechs dieser Klone waren nur resistent gegenüber dem Phagen vB\_Pae-CS2310 und ein Klon entwickelte eine Resistenz gegen beide einzelnen Phagen. 87 % aller Klone entwickelten bei bestehender Sensibilität gegenüber dem Cocktail eine Resistenz gegen vB\_Pae-CS2310. Ein weiterer durch den Cocktail lysierter Klon erwies sich als empfindlich gegen die beiden einzelnen Phagen.

Von dem Stamm *P. aeruginosa* ILH 02778 konnten nur 55 Klone im Spot Assay untersucht werden. 15 % dieser getesteten Klone erwiesen sich als resistent gegen den Phagencocktail. Während vier dieser Klone zudem resistent gegen beide einzelnen Phagen waren, zeigten die anderen vier eine Resistenz nur gegenüber dem Phagen vB\_Pae-CS2310. Weitere 80 % der Klone waren zwar gegenüber dem Phagen vB\_Pae-CS2310 resistent, wurden jedoch durch

den Phagencocktail lysiert. Drei weitere gegenüber dem Cocktail sensible Klone waren auch durch die beiden einzelnen Phagen lysierbar.

Der Stamm *P. aeruginosa* ILH 02781 war in 74 % der 57 gewonnenen Klone resistent gegenüber dem Phagencocktail. 41 dieser Klone waren gegen beide einzelnen Phagen resistent, ein Klon jedoch nur gegen vB\_Pae-TbilisiM32. Von den 26 % gegenüber dem Cocktail empfindlichen Klone waren zehn ebenfalls nur gegenüber vB\_Pae-TbilisiM32 resistent, sowie zwei nur gegenüber vB\_Pae-CS2310. Drei weitere Klone wurden sowohl durch den Cocktail als auch die beiden einzelnen Phagen lysiert.

Alle Klone des Stamms *P. aeruginosa* ILH 02759 wurden weder durch den Cocktail noch durch einen der einzeln eingesetzten Phagen lysiert.

Tabelle 10: Spot Assays zur Feststellung einer Resistenzentwicklung nach Inkubation zur Biofilmprävention

Stamm (n)	sensibel gegenüber Cocktail				resistent gegenüber Cocktail			
	+/+	+/-	-/+	-/-	+/+	+/-	-/+	-/-
ILH 02763 (60)	1	52	0	0	0	6	0	1
ILH 02781 (57)	3	2	10	0	0	0	1	41
ILH 02680 (60)	10	0	0	0	0	4	0	46
ILH 02774 (50)	9	1	19	0	0	3	0	18
ILH 02778 (55)	3	44	0	0	0	4	0	4

+/+ Lyse durch beide Phagen; +/- Lyse durch vB\_Pae-TbilisiM32; -/+ Lyse durch vB\_Pae-CS2310; -/- Lyse durch keinen der beiden Phagen

## 4.4. Bekämpfung eines Biofilms

### 4.4.1. Biofilm Assay

Zur Bekämpfung eines bei 37 °C über 20 h entwickelten Biofilms wurde dieser mit einem Phagencocktail aus den Bakteriophagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 behandelt und erneut 6 h bzw. 24 h bebrütet (Abbildung 12 und Abbildung 13). Nach der zusätzlichen sechsständigen Inkubation in BHI wiesen alle acht getesteten Stämme weiterhin starke Biofilme auf. Auch nach zusätzlicher Inkubation von 24 h verfügten alle acht in BHI inkubierten Stämme über eine deutliche Biofilmmasse, die jedoch etwas schwächer ausfiel als nach den zusätzlichen 6 h.

Bei Inkubation mit dem Phagencocktail über 6 h konnte der Biofilm bei sechs von acht Stämmen (75 %) reduziert werden. Neben der Positivkontrolle *P. aeruginosa* DSM 25641 mit einer Reduktion um 57 % wurde auch die Biofilmmasse der Stämme *P. aeruginosa* ILH 02678 um 74 %, ILH 02680 um 98 %, ILH 02763 um 95 %, ILH 02774 um 89 % und ILH 02781 um 94 % deutlich reduziert.

Bei zwei Stämmen (25 %) konnte nach Inkubation mit dem Phagenscocktail über 6 h nur eine statistisch nicht signifikante Reduktion der Biofilmmasse erreicht werden. Neben der Negativkontrolle *P. aeruginosa* ILH 02759, deren OD um 17 % reduziert wurde, war auch die Biofilmmasse des Stammes *P. aeruginosa* ILH 02778 um lediglich 5 % reduziert.

Bei Inkubation mit dem Phagenscocktail über 24 h war einzig die Biofilmmasse des Referenzstamms *P. aeruginosa* DSM 25641 bei Inkubation mit dem Phagenscocktail um 79 % reduziert.

Bei zwei der acht Stämme (25 %) waren nur geringe Unterschiede in der Biofilmmasse bei Inkubation mit und ohne Phagenscocktail messbar. Neben der Negativkontrolle *P. aeruginosa* ILH 02759 mit einer Reduktion von 19 % war auch der Stamm *P. aeruginosa* ILH 02778 mit einer Steigerung der Biofilmmasse um 13 % statistisch nicht signifikant durch den Phagenscocktail beeinflusst.

Bei fünf Stämmen (62,5 %) war die Biofilmmasse bei Inkubation mit dem Phagenscocktail über 24 h höher als in der korrespondierenden BHI-Kontrolle. Bei dem Stamm *P. aeruginosa* ILH 02678 erfolgte eine Steigerung um 32 %, bei *P. aeruginosa* ILH 02680 um 103 %, bei *P. aeruginosa* ILH 02763 um 251 %, und bei *P. aeruginosa* ILH 02774 um 91 %, sowie auch *P. aeruginosa* ILH 02781 um jedoch statistisch nicht signifikante 20 %.

Zur Bekämpfung des bei 12 °C über 68 h entwickelten Biofilms wurde dieser ebenfalls mit einem Phagenscocktail aus den Bakteriophagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 behandelt und erneut 24 h bzw. 72 h inkubiert (Abbildung 14 und Abbildung 15). Nach 24-stündiger Inkubation mit BHI konnten bei allen acht getesteten Stämmen weiterhin erkennbare Biofilme ermittelt werden. Nach 72 h wurde eine im Vergleich zu 24 h weiter zugenommene Biofilmmasse gemessen.

Bei Inkubation mit dem Phagenscocktail über 24 h waren nur bei drei der acht *P. aeruginosa*-Stämme statistisch signifikante Reduktionen der Biofilmmasse ermittelbar. Während bei *P. aeruginosa* ILH 02763 eine Reduktion um nur 10 % erkennbar war, fiel sie bei den *P. aeruginosa*-Stämmen ILH 02778 und DSM 25641 mit 21 % und 22 % deutlicher aus. Die Reduktionen der *P. aeruginosa*-Stämme ILH 02680 und ILH 02759 um 3 % bzw. 10 % waren statistisch nicht signifikant. Die Stämme *P. aeruginosa* ILH 02774 und ILH 02781 wiesen mit einer Steigerung der Biofilmmasse um 3 % bzw. 4 % nur statistisch nicht signifikante Unterschiede im Vergleich zur Inkubation mit BHI auf, wohingegen der Stamm *P. aeruginosa* ILH 02678 eine um 132 % gesteigerte Biofilmmasse bei Inkubation mit dem Phagenscocktail aufwies.

Bei Inkubation mit dem Phagenscocktail über 72 h waren alle acht Stämme in der Biofilmmasse reduziert. Besonders deutliche Reduktionen erfolgten bei *P. aeruginosa* ILH 02678 und der Positivkontrolle *P. aeruginosa* DSM 25641 (81 % und 63 %). Auch *P. aeruginosa* ILH 02781,



ILH 02680 und ILH 02778 wiesen mit 36 %, 33 % bzw. 27 % deutliche Reduktionen auf. Etwas weniger stark und statistisch nicht signifikant reduziert waren die Negativkontrolle *P. aeruginosa* ILH 02759 mit einer Reduktion um 18 %, sowie die Stämme *P. aeruginosa* ILH 02763 und ILH 02774 (7 % und 4 %).

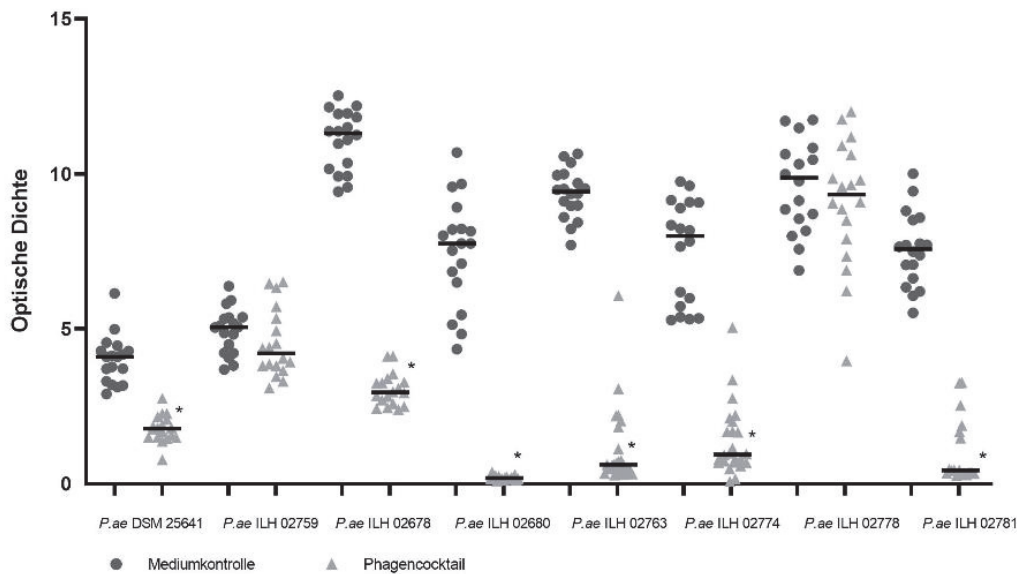


Abbildung 12: Eliminierung eines etablierten Biofilms nach 6 h bei 37 °C

Acht etablierte *P. aeruginosa*-Biofilme wurden bei 37 °C mit einem Phagencocktail aus den beiden Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 inkubiert und nach 6 h die Biofilmmasse bestimmt. Dargestellt sind die einzelnen Werte der OD sowie der Median.

\*: Reduktion durch den Phagencocktail statistisch signifikant mit p-Wert < 0,05

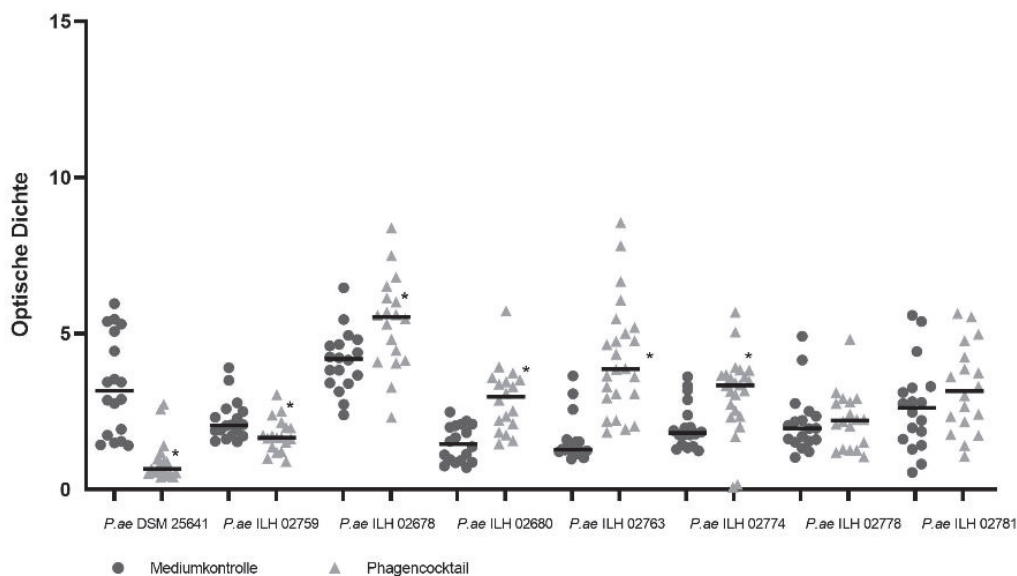


Abbildung 13: Eliminierung eines etablierten Biofilms nach 24 h bei 37 °C

Acht etablierte *P. aeruginosa*-Biofilme wurden bei 37 °C mit einem Phagencocktail aus den beiden Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 inkubiert und nach 24 h die Biofilmmasse bestimmt. Dargestellt sind die einzelnen Werte der OD sowie der Median.

\*: Reduktion durch den Phagencocktail statistisch signifikant mit p-Wert < 0,05

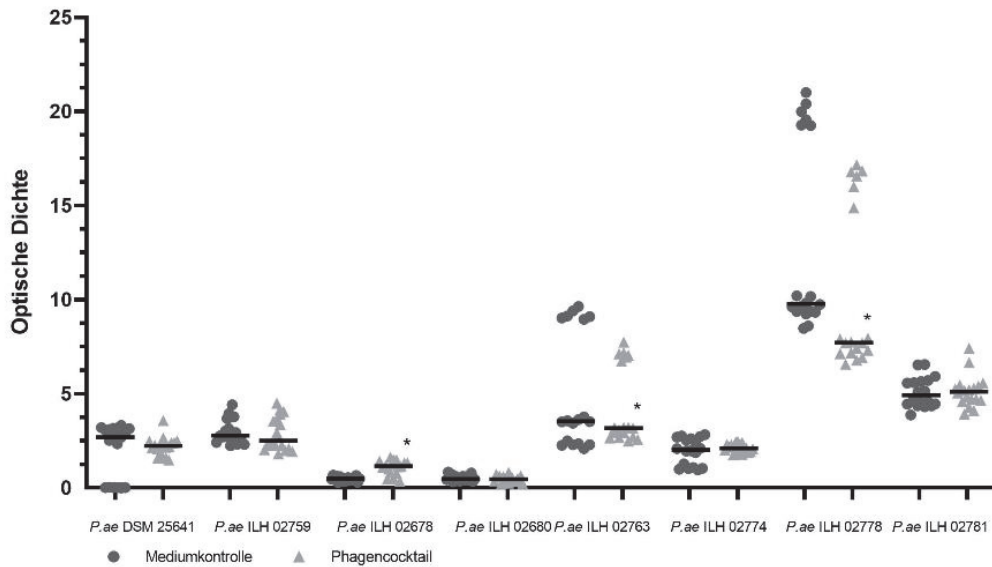


Abbildung 14: Eliminierung eines etablierten Biofilms nach 24 h bei 12 °C

Acht etablierte *P.aeruginosa*-Biofilme wurden bei 12 °C mit einem Phagencocktail aus den beiden Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 inkubiert und nach 24 h die Biofilmmasse bestimmt. Dargestellt sind die einzelnen Werte der OD sowie der Median.

\*: Reduktion durch den Phagencocktail statistisch signifikant mit p-Wert < 0,05

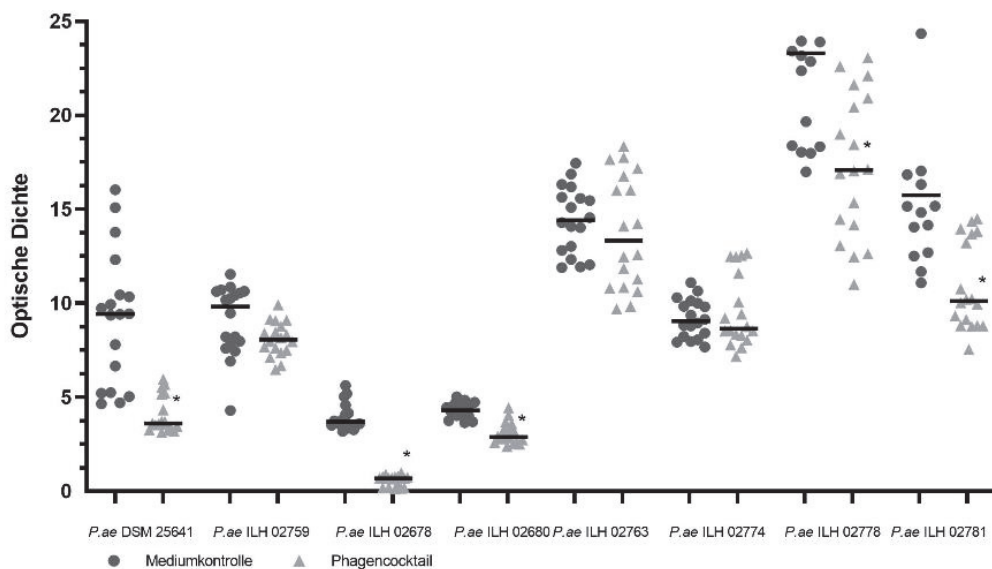


Abbildung 15: Eliminierung eines etablierten Biofilms nach 72 h bei 12 °C

Acht etablierte *P.aeruginosa*-Biofilme wurden bei 12 °C mit einem Phagencocktail aus den beiden Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 inkubiert und nach 72 h die Biofilmmasse bestimmt. Dargestellt sind die einzelnen Werte der OD sowie der Median.

\*: Reduktion durch den Phagencocktail statistisch signifikant mit p-Wert < 0,05

#### 4.4.2. Resistente Klone nach Inkubation

Um die Resistenzentwicklung nach Inkubation mit dem Phagencocktail bei 37 °C nachverfolgen zu können, wurden aus jeweils zwei Wells pro Stamm und Ansatz 10 Klone gewonnen (n=60) und anschließend mithilfe eines Spot Assays erneut auf ihre Sensibilität gegen die Bakteriophagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 sowie den Cocktail aus beiden Phagen getestet (Tabelle 11 und Tabelle 12). Bei Inkubation über 6 h wuchs der Referenzstamm *P. aeruginosa* DSM 25641 in keinem der Ausstriche an, sodass keine Spot Assays durchgeführt werden konnten.

Von dem Stamm *P. aeruginosa* ILH 02678 konnten nur 14 Klone isoliert und untersucht werden, 93 % davon waren weiterhin durch beide Phagen und den Cocktail lysierbar, ein Klon entwickelte eine Resistenz gegen beide Phagen und den Cocktail.

Von den 60 Klonen des Stamms *P. aeruginosa* ILH 02680 waren 78% sowohl resistent gegenüber dem Cocktail als auch beiden Phagen. Die restlichen Klone erwiesen sich als weiterhin empfindlich gegenüber dem Cocktail und beiden einzeln applizierten Phagen.

Nur 18 % der 50 gewonnen Klone des Stamms *P. aeruginosa* ILH 02763 entwickelten eine Resistenz gegenüber dem Phagencocktail, davon waren vier Klone resistent gegen beide Phagen und fünf Klone nur gegen den Phagen vB\_Pae-CS2310. 50 % der Klone wurden sowohl durch den Cocktail als auch durch die beiden einzelnen Phagen lysiert, die restlichen 16 durch den Cocktail lysierten Klone entwickelten jedoch eine Resistenz gegen den Phagen vB\_Pae-CS2310.

Von den 59 getesteten Klonen des Stamms *P. aeruginosa* ILH 02774 waren lediglich 3% resistent sowohl gegen den Cocktail als auch gegen die beiden einzelnen Phagen. 51 % der Klone erwiesen sich als empfänglich gegenüber dem Cocktail und den beiden einzelnen Phagen. 46 % aller Klone konnten zwar weiterhin durch den Cocktail lysiert werden, entwickelten aber eine Resistenz gegenüber dem Phagen vB\_Pae-TbilisiM32.

Alle 59 Klone des Stamms *P. aeruginosa* ILH 02778 waren durch den Cocktail weiterhin lysierbar, 36 % davon auch durch beide einzelnen Phagen. 64 % der Klone entwickelten hingegen eine Resistenz gegen den Phagen vB\_Pae-TbilisiM32.

Von *P. aeruginosa* ILH 02781 konnten nur 42 Klone isoliert werden, 24% davon erwiesen sich als resistent sowohl gegen den Cocktail als auch gegen beide einzelnen Phagen. Von den durch den Cocktail lysierten Klonen waren jeweils zwei nur durch einen der beiden Phagen lysierbar und 67 % der Klone waren sowohl gegen den Cocktail als auch beide Phagen sensibel.

Der als Negativkontrolle mitgeführte Stamm *P. aeruginosa* ILH 02759 war in allen Spot Assays weder durch die einzeln applizierten Phagen noch durch den Cocktail lysierbar.

Tabelle 11: Spot Assays zur Feststellung einer Resistenzentwicklung nach 6 h Inkubation zur Eliminierung eines Biofilms

Stamm (n)	sensibel gegenüber Cocktail				resistent gegenüber Cocktail			
	+/+	+/-	-/+	-/-	+/+	+/-	-/+	-/-
ILH 02678 (14)	13	0	0	0	0	0	0	1
ILH 02680 (60)	13	0	0	0	0	0	0	47
ILH 02763 (50)	25	16	0	0	0	5	0	4
ILH 02774 (59)	30	0	27	0	0	0	0	2
ILH 02778 (59)	21	0	38	0	0	0	0	0
ILH 02781 (42)	28	2	2	0	0	0	0	10

+/+ Lyse durch beide Phagen; +/- Lyse durch vB\_Pae-TbilisiM32; -/+ Lyse durch vB\_Pae-CS2310; -/- Lyse durch keinen der beiden Phagen

Bei den Ausstrichen des Referenzstamms *P. aeruginosa* DSM 25641 konnten nach Inkubation über 24 h insgesamt nur 12 Klone gewonnen werden. Diese waren alle weiterhin durch den Cocktail lysierbar, allerdings wurden nur drei Klone nach der Inkubation mit dem Phagencocktail noch durch beide Phagen lysiert. 75 % der 12 Klone waren bei Resistenz gegen den Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 nur noch durch den Phagen vB\_CS-2310 lysierbar.

Von dem Stamm *P. aeruginosa* ILH 02678 konnten 34 Klone gewonnen werden, wovon 94 % resistent gegen den Cocktail und beide einzelnen Phagen waren. Die zwei weiteren Klone wurden durch den Cocktail lysiert, davon einer durch beide einzelnen Phagen und einer nur durch den Phagen vB\_Pae-Tbilisi32.

Alle 59 getesteten Klone des Stammes *P. aeruginosa* ILH 02680 waren resistent gegen beide einzelnen Phagen und entsprechend auch gegen den Phagencocktail.

Alle 56 Klone des Stammes *P. aeruginosa* ILH 02763 waren durch den Phagencocktail lysierbar. Davon waren 73 % nur durch den Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und 25 % weiterhin durch beide Phagen lysierbar. Einer der Klone war nur gegenüber dem Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 resistent.

Von dem Stamm *P. aeruginosa* ILH 02774 waren 60 % der 58 untersuchten Klone resistent gegen den Cocktail, wobei davon 33 eine Resistenz gegenüber beiden Phagen und zwei Klone eine Resistenz nur gegenüber dem Phagen vB\_Pae-CS2310 aufwiesen. 24 % der Klone waren durch den Phagencocktail sowie nur durch den Phagen vB\_Pae-CS2310 lysierbar. Zwei der durch den Cocktail lysierbaren Klone entwickelten hingegen eine Resistenz nur gegenüber dem Phagen vB\_Pae-CS2310. Die restlichen 12 % der Klone waren sowohl gegenüber dem Cocktail als auch beiden einzelnen Phagen sensibel.

Bei den 57 isolierten Klonen des Stammes *P. aeruginosa* ILH 02778 waren lediglich 9% resistent gegenüber dem Phagencocktail. Diese Klone waren darüber hinaus nur durch den Phagen vB\_Pae-CS2310 lysierbar. Weitere elf Klone waren ebenfalls nur durch den einzeln

applizierten Phagen vB\_Pae-CS2310 lysierbar, erweisen sich aber als sensibel gegenüber dem Phagencocktail. Weitere 71 % der Klone blieben auch nach der Inkubation mit dem Phagencocktail sensibel gegenüber dem Cocktail und den beiden einzelnen Phagen.

Von den 60 Klonen des Stamms *P. aeruginosa* ILH 02781 waren 93 % resistent gegenüber dem Phagencocktail und zugleich auch gegenüber beiden einzelnen Phagen. Die anderen vier Klone konnten durch beide Phagen und den Cocktail lysiert werden.

Alle Klone des Stammes *P. aeruginosa* ILH 02759 waren sowohl gegen den Phagencocktail als auch gegen die einzeln eingesetzten Phagen resistent.

Tabelle 12: Spot Assays zur Feststellung einer Resistenzentwicklung nach 24 h Inkubation zur Eliminierung eines Biofilms

Stamm (n)	sensibel gegenüber Cocktail				resistent gegenüber Cocktail			
	+/+	+/-	-/+	-/-	+/+	+/-	-/+	-/-
ILH 02678 (34)	1	1	0	0	0	0	0	32
ILH 02680 (59)	0	0	0	0	0	0	0	59
ILH 02763 (56)	14	41	1	0	0	0	0	0
ILH 02774 (58)	7	2	14	0	0	2	0	33
ILH 02778 (57)	41	0	11	0	0	0	5	0
ILH 02781 (60)	4	0	0	0	0	0	0	56
DSM 25641 (12)	3	0	9	0	0	0	0	0

+/+ Lyse durch beide Phagen; +/- Lyse durch vB\_Pae-TbilisiM32; -/+ Lyse durch vB\_Pae-CS2310; -/- Lyse durch keinen der beiden Phagen

#### 4.5. Genomsequenzierung und Bioinformatische Auswertung

Von den 44 Genen, die anhand von in Literaturrecherchen beschriebener oder vermuteter Beteiligung an einer Phagenresistenz ausgewählt worden waren, konnten 13 bei keinem der acht *P. aeruginosa*-Stämme gefunden werden.

Der Wildstamm *P. aeruginosa* ILH 02678 besitzt 26 der untersuchten 31 Gene. Bei dem einzigen Klon, der eine Resistenz gegen vB\_Pae-CS2310 entwickelte, war jedoch keine Genveränderung oder -deletion bei einem dieser Gene feststellbar. Lediglich ein anderer Klon wies eine fehlende Anfangssequenz bis einschließlich der Nukleinbase 308 (5'3'-Richtung) des Gens *algC* auf, was jedoch keine Auswirkung auf die Sensibilität gegenüber den beiden Phagen hatte.

Von den 31 untersuchten Genen wurden bei dem Wildstamm *P. aeruginosa* ILH 02680 30 gefunden. Obwohl mehrere Phänotypen Resistenzen aufwiesen, konnte jedoch bei keinem dieser 30 Genen eine Mutation nachgewiesen werden.

Der Wildstamm *P. aeruginosa* ILH 02763 codiert für 26 der 31 untersuchten Gene. Eine Mutation konnte jedoch nur in dem *galU*-Gen eines gegen vB\_Pae-CS2310 resistenten Klons

gefunden werden, bei dem abgelesen in 5'3'-Richtung auf Position 38 die Nukleinbase G gegen T ausgetauscht war. Dies führte zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz. Alle anderen resistenten und sensiblen analysierten Klone wiesen jedoch keine Mutationen in diesen 26 Genen auf.

Bei dem Wildstamm *P. aeruginosa* ILH 02774 konnten 26 der 31 Gene nachgewiesen werden. Einige der Klone zeigten auf BHI-Platte eine rote Koloniefärbung, diesen fehlte unabhängig von ihren Resistenzen gegenüber den Bakteriophagen die Gene *galU* und *hmgA*. Ein vollständig sensibler Klon mit unauffälliger gelblich-grüner Koloniefärbung wies eine Mutation auf dem Gen *galU* in Form eines Nukleinbasenaustauschs von A zu C auf Position 110 in 5'3'-Richtung gelesen auf, was zu einer veränderten Aminosäuresequenz führte. Zudem wies ein gegenüber vB\_Pae-TbilisiM32 resistenter Klon eine Punktmutation auf dem Gen *pilR* auf, dieser Austausch der Nukleinbase C zu T auf Position 754 (5'3'-Richtung) resultierte in einer fehlenden Aminosäuresequenz. Ein gegenüber allen Phagen sensibler Klon verfügte nicht mehr über die Gene *pilJ* und *pilT*.

Der Wildstamm *P. aeruginosa* ILH 02778 codiert für 30 der 31 untersuchten Gene, von denen in allen untersuchten Klonen, unabhängig vom Resistenzmuster, alle 30 Gene weiterhin vorhanden waren und keines eine Mutation aufwies.

Von den 31 untersuchten Genen konnten bei dem Wildstamm *P. aeruginosa* ILH 02781 27 nachgewiesen werden. Alle Klone waren sensibel gegenüber den Phagen. Einer der untersuchten Klone wies eine Veränderung des Gens *galU* in Form eines Austauschs der Nukleinbase G zu A auf Position 322 (5'3'-Richtung) auf. Dies führte zu einer veränderten Aminosäuresequenz. Ebendieses Gen *galU* fehlte einem weiteren Klon, bei diesem Klon fehlte zudem die Anfangssequenz bis einschließlich Position 312 des Gens *algC* (beide 5'3'-Richtung). Zusätzlich fehlte bei diesem Klon die Schlusssequenz ab Position 1226 (3'5'-Richtung) des Gens *hmgA*, welches außerdem auf Position 1215 einen Nukleinbasenaustausch von C zu T aufwies, was jedoch keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz hatte. Dieser stark mutierte Klon zeigte rotes Wachstum. Bei einem dritten Klon des *P. aeruginosa*-Stamms ILH 02781 war das Gen *pilT* verändert, auf dessen Position 707 in 5'3'-Richtung abgelesen war die Nukleinbase C gegen T ausgetauscht, wodurch auch die Aminosäuresequenz verändert war.

Bei dem Referenzstamm *P. aeruginosa* DSM 25641 konnten 27 der untersuchten Gene identifiziert werden, die bei keinem der Klone eine Mutation aufwiesen.

Der Stamm *P. aeruginosa* ILH 02759 codiert für 23 der untersuchten 31 Gene, die Klone wurden jedoch aufgrund der Resistenz des Wildstammes gegenüber beiden Phagen nicht untersucht.

Da die untersuchten Gene keine der Resistenzen gegen vB\_Pae-CS2310 oder vB\_Pae-TbilisiM32 bedingen, wurden komplette Genomabgleiche der Wildstämme gegen ihre jeweiligen Klone durchgeführt. Dabei wurden ebenfalls keine Gen-Deletionen identifiziert, die aufgrund ihres Verlusts eine Resistenz gegenüber einem der beiden Phagen auslösen könnten.



## 5. Diskussion

### 5.1. Wirtsspektrum

Aufgrund der sich immer weiter ausbreitenden Resistenzen von *P. aeruginosa* gegen Antibiotika aber auch Desinfektionsmittel gewinnen alternative Behandlungsmethoden an Bedeutung. Besonders Bakteriophagen stellen eine interessante Möglichkeit der Bekämpfung von *P. aeruginosa* dar. Der Anspruch an die einzusetzenden Phagen sollte immer sein, dass sie ein möglichst großes Wirtsspektrum an *P. aeruginosa*-Stämmen lysieren und zudem lediglich virulente Phagen zum Einsatz kommen, um eine Verbreitung von Resistenzen zu vermeiden.

Zur Ermittlung des Wirtsspektrums der beiden virulenten Bakteriophagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 sowie dem Cocktail aus beiden wurden Spot Assays auf 30 *P. aeruginosa*-Wildstämmen durchgeführt. Der Phagencocktail war dabei in der Lage, 25 der 30 (83 %) getesteten *P. aeruginosa*-Stämme zu lysieren und liegt damit leicht unter dem Bereich anderer erfolgreich getesteten *P. aeruginosa*-Phagencocktails, bei denen Lysen von bis zu über 90 % der 58 bzw. 22 Stämme erreicht wurden (Forti et al. 2018; Alves et al. 2016). Der Phage vB\_Pae-CS2310 wies ein dem Cocktail sehr ähnliches Wirtsspektrum von 80 % auf, lediglich einer der durch den Cocktail lysierten Stämme war gegen den Phagen vB\_Pae-CS2310 resistent. Der Phage vB\_Pae-TbilisiM32 hingegen war nur in der Lage, 16 der 30 (53 %) Stämmen zu lysieren und wies damit ein deutlich geringeres Wirtsspektrum auf. Der hier untersuchte Phagencocktail sollte dementsprechend vor einem Einsatz *in vivo* um weitere Bakteriophagen erweitert werden, die das Wirtsspektrum von vB\_Pae-CS2310 zusätzlich ergänzen, und so der Cocktail die zumindest theoretische Fähigkeit erhält, ein maximales Spektrum an *P. aeruginosa*-Stämmen zu lysieren.

### 5.2. Zellzahlreduktion durch Bakteriophagen

Zur Ermittlung der durch die Bakteriophagen erreichte Zellzahlreduktion in Flüssigmedium wurden Experimente über einen Zeitraum von 48 h (37 °C) bzw. 72 h (12 °C) an acht *P. aeruginosa*-Stämmen durchgeführt. Dabei wurden bei 37 °C mit Ausnahme der Negativkontrolle die Zellzahl aller Stämme sowohl durch die einzelnen Bakteriophagen als auch den Cocktail reduziert, es entwickelten sich bei einzelner Applikation der Phagen aber teilweise bereits zwischen 1,5 h und 6 h Resistenzen, sodass die Zellzahl wieder anstieg. Zwei der Stämme blieben durch den Cocktail dauerhaft reduziert und der Anstieg der Zellzahl der anderen Stämme setzte bei Inkubation mit dem Cocktail meist erst nach 6 h ein. Obwohl der hier angewendete Cocktail nur aus zwei Phagen bestand, konnte er die Zellzahl von *P. aeruginosa* bereits länger unterdrücken als die einzeln applizierten Phagen und ist demnach als effektiver anzusehen. Dies war zu erwarten, da die Bakteriophagen auf Genomebene

keinerlei Ähnlichkeiten aufweisen und verschiedenen Spezies zuzuordnen sind, sowie auch morphologisch unterschiedlichen Gruppen angehören (Perleth et al. 2019) und somit sehr wahrscheinlich über unterschiedliche Wege angreifen, was eine Kombinationstherapie erfolgreich macht. Eine Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber Phagen und deren Cocktails ist dennoch weit verbreitet und beruht auf verschiedenen Abwehrmechanismen seitens der Bakterien (Labrie et al. 2010). Insbesondere *P. aeruginosa* sind durch ihre Genomgröße und den hohen Anteil an akzessorischen Genomabschnitten sehr mutationsfreudig (Valot et al. 2015) und damit, verstärkt durch die geringe Generationszeit, zu einer schnellen Resistenzentwicklung in der Lage.

Bei 12 °C wurde lediglich der Phagencocktail getestet, gegen den innerhalb von 72 h nur drei Stämme eine Resistenz entwickelten. Erklären lässt sich das damit, dass *P. aeruginosa* zwar bei Temperaturen von 4 - 42 °C wachsen kann, das Optimum aber bei 37 °C liegt (Labauve und Wargo 2012). Eine flachere Wachstumskurve in der Mediumkontrolle sowie die geringere bzw. spätere Resistenzentwicklung waren daher zu erwarten.

Alle acht *P. aeruginosa*-Stämme zeigten vergleichbare Entwicklungen in beiden Temperaturansätzen. Eine Ausnahme bildete der *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02781, welcher durch den Cocktail bei beiden Temperaturansätzen nach 1,5 h soweit reduziert wurde, dass er nicht mehr detektierbar war. Bei 37 °C entwickelte sich aber bereits nach 6 h eine Resistenz, wohingegen bei 12 °C über den gesamten Zeitraum keine erneute Detektion möglich war. Dieser Stamm scheint in seiner Fitness durch die ungünstigeren Temperaturbedingungen stärker beeinträchtigt zu sein. Auch der *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02680 zeigte bei den beiden Temperaturansätzen unterschiedliche Wachstumsverläufe, während bei 12 °C lediglich ein verzögertes Wachstum zu beobachten war, war die Zellzahl bei 37 °C für kurze Zeit nicht mehr detektierbar. Möglicherweise sind bei 12 °C die Phagenrezeptoren weniger exprimiert und infolgedessen kann eine höhere Anzahl an Bakterien überleben, sodass sich das Wachstum von *P. aeruginosa* ILH 02680 verzögert, ohne dass jedoch eine deutliche Reduktion hervorgerufen wird. Bereits bei Temperaturen von 22 °C konnte gezeigt werden, dass eine unterschiedliche Regulierung von Genen bei *P. aeruginosa* stattfindet (Barbier et al. 2014), sodass es auch bei 12 °C zu einer Veränderung der Expression der Gene kommen kann. Interessanterweise reduziert bei diesem Stamm lediglich der Phage vB\_Pae-TbilisiM32 die Zellzahl in Flüssigmedium, während vB\_Pae-CS2310 keinen Einfluss auf die Zellzahl hatte. Diese Differenzen zwischen Ergebnissen im Spot Assay und in Flüssigkultur kommen mit etwa 6 % durchaus vor (Xie et al. 2018). Da die Konsistenz des Softagars Einfluss auf die Beweglichkeit und Diffusion sowohl des Phagen als auch der Bakterien hat, findet eine andere Interaktion zwischen den Mikroorganismen (Adsorptionsrate, Latenzzeit, Wurfgröße) als in Flüssigkultur statt. Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse kann auch die Lysis from Without sein, da die in diesen Experimenten eingesetzte MOI von 10 bis 100 sehr hoch ist.

Auch Prophagen oder Bacteriocine, die als Restbestandteile im Phagenlysat vorkommen können, sind eine mögliche Erklärung (Mirzaei und Nilsson 2015). Bei der Auswahl geeigneter Phagen für einen Cocktail sollte dies bedacht werden.

Leichte Differenzen zwischen den Temperaturansätzen wies auch der *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02763 auf. Bei 12 °C erfolgte eine kontinuierliche Reduktion der Zellzahl durch den Phagencocktail, lag aber über die gesamte Zeit oberhalb des Detektionslimits. Bei 37 °C wurde die Zellzahl durch den Cocktail auf ein nicht detektierbares Level reduziert, allerdings verglichen mit den anderen Stämmen über einen längeren Zeitraum und somit analog zur Reduktionskurve bei der niedrigeren Temperatur. Es ist nicht auszuschließen, dass eine weitere Reduktion auch bei 12 °C nach länger andauernder Inkubationszeit erreicht werden kann. Ob sich wie bei 37 °C eine Resistenz einstellen würde, lässt sich nicht beurteilen.

Für die bei 37 °C ansteigenden Phagentiter von vB\_Pae-TbilisiM32 bei den *P. aeruginosa*-Stämmen DSM 25641 ILH 02678, ILH 02778 und ILH 02781, sowie dem angestiegenen Phagentiter des Cocktails bei den *P. aeruginosa*-Stämmen ILH 02778 und ILH 02781 konnte kein Zusammenhang zu den Wachstumskurven der entsprechenden Stämme gefunden werden, da ein sprunghafter Anstieg des Phagentiters zeitgleich mit der Lyse der Bakterienzellen zu erwarten gewesen wäre. Der Anstieg der Phagentiter lässt sich eher mit einer höheren Wurfgröße im Vergleich zum Referenzstamm erklären. Der Phagentiterabfall des Phagen vB\_Pae-CS2310 beim *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02774 hingegen verlief parallel zu dem einsetzenden Wachstum der Zellzahl, wofür eine Adsorption der Phagen in die Bakterienzellen ursächlich sein kann. Da dieser Wachstumseffekt jedoch bei keinem der anderen Stämme zu beobachten war, ist auch hier eine geringere Wurfgröße des Phagen auf diesem Stamm verglichen mit dem Referenzstamm die wahrscheinlichste Ursache. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Wirksamkeit des Phagen zur Lyse des Bakterienstamms in Flüssigkultur.

Der bei 12 °C unveränderte Phagentiter lässt sich durch die geringere Generationszeit bei diesen Temperaturen erklären, auch unterlag der Phagentiter des Cocktails bereits bei 37 °C geringeren Schwankungen als bei den einzeln applizierten Phagen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bei der Optimaltemperatur von 37 °C ermittelten Reduktions- und Wachstumskurven der *P. aeruginosa*-Stämme den Verläufen bei 12 °C entsprechen, sieht man vom erwarteten langsameren Wachstum bei der kälteren Temperatur ab. Durch die bei 12 °C ermittelten Werte lassen sich eher Schlüsse auf die Wachstumsverläufe in lebensmittelverarbeitenden Betrieben ziehen. Die Ergebnisse zeigen, dass auch hier der Phagencocktail effektiv ist und über lange Zeit die Bakterienzahl reduzieren oder zumindest ein Wachstum verhindern kann. Nach VO (EG) 852/2004 muss die Reinigung und Desinfektion so häufig erfolgen, dass kein Kontaminationsrisiko besteht (Eu-Parlament und Eu-Ministerrat 2004). Es ist davon auszugehen, dass an Schlachthöfen sowie in

lebensmittelverarbeitenden Betrieben mindestens einmal täglich eine Reinigung und Desinfektion erfolgt, sodass die über diesen Zeitraum hinausgehenden ermittelten Werte von untergeordnetem Interesse sind, da hier bereits Chemikalien oder andere eingesetzte Mittel zur Bekämpfung unterstützend wirken können. In verschiedenen Studien wurde bereits eine äußerst vielversprechende Kombinationstherapie aus Phagen und Antibiotika zur Behandlung in Flüssigmedium und von Infektionen mit *P. aeruginosa* untersucht (Chaudhry et al. 2017; Nouraldin et al. 2016), was jedoch in lebensmittelverarbeitenden Betrieben keine Lösung sein kann. Stattdessen sollten Reinigungs- und Desinfektionsmittel so gewählt werden, dass eine Kombination mit den Phagen zu einem bestmöglichen Ergebnis führt. Dabei scheint Chlor, was in der Lebensmittelindustrie bereits häufig eingesetzt wird, eine gute Möglichkeit zu sein. Chlor in Kombination mit Bakteriophagen konnte in einer Studie eine *P. aeruginosa*-Biofilmbildung um bis zu 94 % reduzieren, während die einzelne Applikation von Phagen eine Biofilmbildung nur um 80 % und von Chlor in Abhängigkeit von der Konzentration um 53-86 % reduzieren konnte (Zhang und Hu 2013), was Rückschlüsse auf die Wirksamkeit einer solchen Kombination in Flüssigmedium zulässt. Die meisten Studien zur Kombinationstherapie beziehen sich jedoch auf die Eliminierung von Biofilmen.

Bei Ermittlung der Resistenzen im Spot Assay nach Inkubation mit den einzelnen Phagen lysierte der Cocktail weiterhin alle *P. aeruginosa*-Stämme bis auf *P. aeruginosa* ILH 02680 nach Inkubation mit vB\_Pae-TbilisiM32. Allerdings entwickelten 97 %, 20 % und 10 % der Klone von *P. aeruginosa* ILH 02778, ILH 02774 und ILH 02763 durch die Inkubation mit vB\_Pae-TbilisiM32 eine Resistenz gegen ebendiesen Phagen. Nach Inkubation mit vB\_Pae-CS2310 bildeten die Klone der *P. aeruginosa*-Stämme ILH 02763, ILH 02680, ILH 02774 und ILH 02678 Resistenzen gegen ebendiesen Phagen aus, betroffen waren 60 %, 37 %, 20 % und 20 % der Klone. Das Überleben von sensiblen Klonen nach Inkubation mit Phagen ist für biofilmbildende und auf Agar-Platte wachsende Bakterien durch eine Schutzwirkung der äußeren resistenten Bakterien beschrieben (Simmons et al. 2020; Eriksen et al. 2018), wohingegen in Flüssigkultur ein wesentlich höherer Anteil an Resistenzen von bis zu 100 % zu erwarten gewesen wäre (Testa et al. 2019). Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die in Flüssigkultur eine bestehende Population von sensiblen Bakterien zeigen. Die Erklärung hierfür ist, dass die resistenten Bakterien in ihrer Fitness eingeschränkt sind, was es den sensiblen Bakterien durch schnelleres Wachstum ermöglicht, Teil der Population zu bleiben, während die Phagen verhindern, dass die resistenten Bakterien durch die schneller wachsenden sensiblen Bakterien verdrängt werden (Bohannan und Lenski 2000). Fraglich ist, ob dieses System bei der hier eingesetzten MOI von bis zu 100 Bestand hat. Da aber auch der Phagentiter der hier untersuchten Stämme über die gesamte Zeit von 48 h stabil bleibt, ist dies ein Indiz dafür, dass sich ein neues Gleichgewicht aus sensiblen und resistenten

Bakterien, sowie die Zellen befallenden und neu freigesetzten Bakteriophagen einstellt (Han und Smith 2012). Zudem scheint bei Inkubation mit Bakteriophagen die Heterogenität der *P. aeruginosa*-Klone verstärkt zu werden, das inkludiert auch sensible Klone (Markwitz et al. 2021).

Erstaunlicherweise bildeten bei den *P. aeruginosa*-Stämmen ILH 02680 und ILH 02778 jeweils 33 % der gewonnenen Klone nach Inkubation mit vB\_Pae-CS2310 nur gegen vB\_Pae-TbilisiM32 Resistenzen aus. Spontane Mutationen kommen bei *P. aeruginosa* durchaus vor, die Raten liegen bei etwa  $5 \times 10^{-4}$  pro Genom pro Generation (Dettman et al. 2016). Eine Kreuzresistenz scheint hingegen unwahrscheinlich, da die Genome der beiden Bakteriophagen sehr unterschiedlich sind und zudem bei den genannten Klonen keine Resistenz gegenüber vB\_PaeCS-2310 auftrat. Auffällig war jedoch, dass die Klone beider Stämme nach Inkubation mit vB\_Pae-TbilisiM32 zu 100 % resistent gegen diesen Phagen waren. Aufgrund dieser starken Resistenzentwicklung und der langen Inkubationszeit der Spot Assays von 20 h ist es möglich, dass bereits ein Rasen aus resistenten Bakterien über die ursprüngliche Lysezone gewachsen war. Dies ist auch für einzelne *Propionibacterium acnes*-Stämme beschrieben, bei denen ausgehend von der Mitte der Plaques ein Neubewuchs durch diese Bakterien erfolgte, welche anschließend Phagenresistenzen aufwiesen (Liu et al. 2015). Dem widerspricht jedoch die Tatsache, dass bei den Spot Assays der Wildstämme in allen Fällen klare Lysezonen zu erkennen waren und somit kein Überwachsen der Kolonien stattgefunden hatte. Jedoch können sich Wildstamm und Klone durch die lange Inkubation von 48 h auch unabhängig von einer Phagenresistenz unterscheiden und unter anderem unterschiedliche Wachstumsraten aufweisen. Beispielsweise zeigen klinische *P. aeruginosa*-Isolate häufig ein langsames Wachstum als Umweltstämme, was sich unter Laborbedingungen wieder umkehren kann (La Rosa et al. 2021). Es ist auch beschrieben, dass *P. aeruginosa* bei einer ausreichenden Nährstoffversorgung in Flüssigmedium zu individuellen Indels neigen, die mit einem erhöhten Fitnesslevel, unter anderem einer höheren Wachstumsrate mit verkürzter Logphase, einhergehen (Grekov et al. 2021). Trotz solcher Erklärungen scheint jedoch eine spontane Mutation, die sich anschließend durchsetzen konnte, am wahrscheinlichsten. Da es sich hierbei vor allem um die *P. aeruginosa*-Stämme ILH 02680 und ILH 02778 handelte, sollten beide Stämme in weiterführenden Studien auf ähnliche Gene und Mutationen abgeglichen werden.

Trotz der sich schnell ausbildenden Resistenzen verfügt der Cocktail aus den beiden Bakteriophagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 bei 37 °C und auch bei 12 °C über starke lytische Eigenschaften auf nahezu alle hier untersuchten *P. aeruginosa*-Stämme. Da Bakterien sich in Biofilmen anders verhalten können als in Flüssigmedium, ist es von weiterem Interesse, welchen Einfluss dieser Phagencocktail auf eine Biofilmbildung hat.

### 5.3. Prävention eines Biofilms

Bei der Prävention der Biofilme, das heißt bei Applikation des Phagenscocktails zum Startpunkt der Biofilmentwicklung, erwies sich der Cocktail als äußerst effektiv. Alle untersuchten Stämme, mit Ausnahme der Negativkontrolle, konnten bei 12 °C in der Entwicklung eines Biofilms gestört werden. Fünf der acht Stämme (63 %) zeigten eine sehr deutliche Reduktion der Biofilmmasse. Dies bestätigt andere Studien, in denen bereits durch Applikation einzelner Phagen eine Biofilmbildung drastisch reduziert werden konnte (Fu et al. 2010). Zudem waren auch alle diese Stämme in Flüssigmedium durch den Cocktail reduziert worden. Die zwei *P. aeruginosa*-Stämme ILH 02680 und ILH 02778, bei denen die Biofilmbildung statistisch nicht signifikant oder weniger deutlich reduziert war, zeigten auch in der Flüssigkultur ein verzögertes Wachstum im Vergleich zur Mediumkontrolle, jedoch keine eindeutige Reduktion (Abbildung 16). Somit lässt sich hier die vorhandene, aber dennoch reduzierte Biofilmbildung erklären, da zu jedem Zeitpunkt das erforderliche Minimum an planktonischen Zellen vorhanden war, die die Initialisierung des Biofilms durch Bindung an die Oberfläche der Wells verursachten, jedoch für eine weitere Formierung von Mikrokolonien und Reifung des Biofilms nicht ausreichten (Brown et al. 2016).

Auch bei 37 °C zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen Prävention des Biofilms und der Wachstumskurve in Flüssigmedium. Die vier *P. aeruginosa*-Stämme, deren Zellzahl in der Flüssigkultur über mindestens 6 h auf ein nicht detektierbares Level gesenkt worden waren, bildeten bei Inkubation mit dem Phagenscocktail sehr geringe Biofilmmassen aus. Die zwei *P. aeruginosa*-Stämme, die neben der Negativkontrolle durch Inkubation über 24 h mit dem Phagenscocktail statistisch nicht signifikant in ihrer Biofilmbildung beeinträchtigt waren, wiesen bereits in Flüssigmedium eine langsamere Reduktion der Zellzahl durch den Cocktail auf (*P. aeruginosa* ILH 02763, ILH 02778). Auch *P. aeruginosa* ILH 02680, dessen Biofilmmasse nur um etwa ein Drittel reduziert war, entwickelte bereits in Flüssigmedium eine sehr schnelle Resistenz gegen den Phagenscocktail.

In der Prävention erwies sich der Phagenscocktail demzufolge ähnlich effektiv wie bei Inkubation in Flüssigmedium.

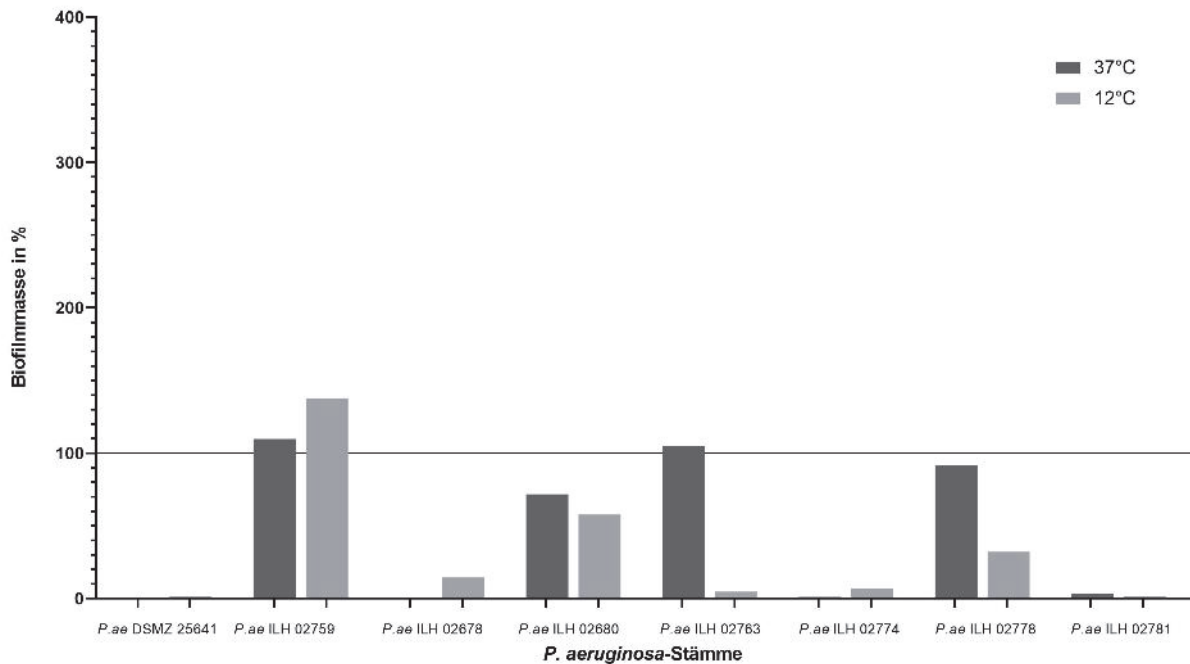


Abbildung 16: Prävention eines Biofilms

Acht *P. aeruginosa*-Stämme wurden mit einem Phagencocktail aus den beiden Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 bei unterschiedlichen Temperaturen (37 °C, 12 °C) inkubiert und anschließend die Biofilmmasse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Biofilmmasse im Vergleich zur Mediumkontrolle (100%, schwarze Linie).

Die in den Spot Assays ermittelten Resistenzen passten nur bedingt zu den Reduktionen des Biofilms. Wie erwartet waren die beiden sowohl in Flüssigmedium, als auch aus dem Überstand der Wells nicht mehr kultivierbaren *P. aeruginosa*-Stämme DSM 25641 und ILH 02678 bei Inkubation mit dem Phagencocktail nicht mehr in der Lage, Biofilme auszubilden. Des Weiteren war die Negativkontrolle *P. aeruginosa* ILH 02759 in der Ausbildung des Biofilms durch den Cocktail nicht beeinträchtigt. Die Erwartung war weiter, dass die Klone der stark ausgeprägten Biofilme eine Resistenz gegenüber dem Cocktail entwickelt hatten, da ein Überleben der Bakterien Voraussetzung für eine Biofilmbildung ist (Brown et al. 2016). Der *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02680 bestätigte diese These und zeigt bei einer Resistenz von 82 % gegenüber dem Cocktail eine nur gering reduzierte Biofilmmasse. Betrachtet man zudem die vier einzelnen Ansätze, so wird deutlich, dass die aus den beiden Ansätzen gewonnen Klone, bei denen die Biofilmmasse deutlich reduziert war, weiterhin sensibel gegen den Cocktail waren. Hingegen waren die beiden Ansätze in ihrer Biofilmbildung kaum beeinflusst, deren Klone eine Resistenz entwickelten. Das unterschiedliche Verhalten von *P. aeruginosa* ILH 02680 in den einzelnen Ansätzen ist ebenfalls durch das Auftreten spontaner Mutationen, wie unter 6.2. für ebendiesen Stamm ausführlicher abgehandelt, erklärbar. Auch bei dem in seiner Biofilmmasse deutlich reduzierten *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02774 waren wie erwartet nur 42 % der Klone resistent gegenüber dem Cocktail.

Bei den anderen Stämmen hingegen konnte keinerlei Zusammenhang zwischen der Resistenz und der Biofilmmasse ermittelt werden. So waren bei dem *P. aeruginosa*-Stämmen ILH 02781 trotz deutlich reduzierter Biofilmmasse 74 % der Klone resistent gegenüber dem Cocktail. Die *P. aeruginosa*-Stämme ILH 02763 und ILH 02778 hingegen waren in ihrer Biofilmbildung nicht signifikant verändert, obwohl sie nur geringe Resistenzen von 12 % und 15 % gegen den Cocktail entwickelten. Es können jedoch gerade in Biofilmen resistente Bakterien nach außen hin eine Barriere bilden, die die sensiblen Bakterien im Inneren des Biofilms schützen und deren weiteres Wachstum ermöglichen (Simmons et al. 2020).

#### 5.4. Bekämpfung eines Biofilms

Bei Behandlung des über 20 h bei 37 °C entwickelten Biofilms war 6 h nach Zugabe des Phagencocktails bei sechs der *P. aeruginosa*-Stämme (75 %) eine signifikante Reduktion des Biofilms erkennbar (Abbildung 17). Lediglich die Negativkontrolle *P. aeruginosa* ILH 02759 und der Stamm ILH 02778 zeigten nur eine unbedeutend geringere Beeinflussung der Biofilmentwicklung. Dies waren zudem die einzigen Stämme, bei denen bei Inkubation im Flüssigmedium die Zellzahl zu jedem Zeitpunkt detektierbar blieb. Somit scheint die Anzahl der Bakterien stets auszureichen, um eine Biofilmentwicklung wie in der Mediumkontrolle zu ermöglichen (Brown et al. 2016). Nach 24 h hingegen entwickelten bis auf *P. aeruginosa* DSM 25641 alle Stämme trotz Phagenapplikation deutliche Biofilme, die zudem bei vier *P. aeruginosa*-Stämmen stärker ausgeprägt waren als die der Mediumkontrolle. Lediglich die Negativkontrolle *P. aeruginosa* ILH 02759 zeigte eine leichte Reduktion der Biofilmmasse bei Inkubation mit dem Phagencocktail, *P. aeruginosa* ILH 02778 und ILH 02781 waren kaum verändert. Solche sich schnell entwickelnden Resistenzen von Bakterien gegenüber Phagen in Biofilmen sind jedoch keine Seltenheit (Pires et al. 2021). In einer weiteren, hier nicht explizit aufgezeigten, am Institut für Lebensmittelhygiene und -sicherheit durchgeführten Versuchsreihe wurde zudem festgestellt, dass die Masse von *P. aeruginosa*-Biofilmen über die Zeit wieder abnimmt. Dieser Peak an Biofilmmasse, die anschließend wieder abnimmt, ist ein bekanntes Phänomen (Morimatsu et al. 2012). Das könnte daran liegen, dass bei normalerweise 3-12 Tage alten Biofilmen die Phase des Detachment beginnt, das heißt eine Ablösung von Teilen des Biofilms oder gar des gesamten Biofilms erfolgt (Kim und Lee 2016). Die Ablösung kann dabei in einem Stück bzw. in größeren Teilen erfolgen, oder, wie hier eher wahrscheinlich, durch die Freisetzung von Klonen, was einer Verbreitung der Bakterien dient. Vergleicht man die Ergebnisse nach 6 h und 24 h, so wird deutlich, dass die Biofilmdichte bei Inkubation mit der Mediumkontrolle über die Zeit abnimmt, während sie bei Inkubation mit dem Phagencocktail bei jenen Stämmen steigt, die nach 6 h noch in ihrer Biofilmbildung eingeschränkt waren und somit frische Biofilme bilden. Bis auf den *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02763 war zudem die ermittelte OD bei den behandelten Biofilmen nach 24 h vergleichbar



mit den Werten der Mediumkontrolle 24 h-alter Biofilme (vgl. Prävention Biofilm). Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass die resistenten Bakterien infolge der Mutation stärkere Biofilme ausbilden als die sensiblen, wenn beispielsweise die Motilität der Bakterien betroffen ist und sie dazu neigen, sich eher an Oberflächen festzusetzen und bereits in Flüssigmedium Verklumpungen bilden (Hosseinidoust et al. 2013; Lacqua et al. 2006). Dies sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Bei den zuvor durch den Cocktail kaum reduzierten *P. aeruginosa*-Stämmen ILH 02759 und ILH 02778 nahm die Biofilmmasse über die Zeit ebenfalls ab und zeigte weiterhin nur geringe Unterschiede zur Inkubation mit der Mediumkontrolle.

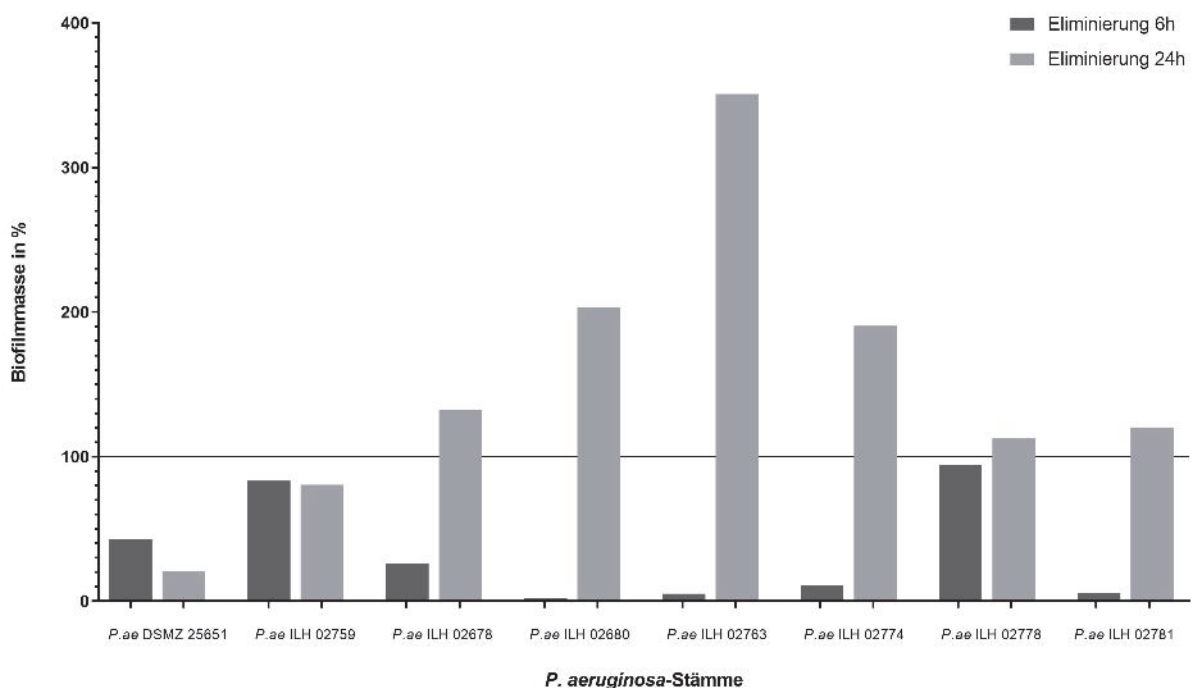


Abbildung 17: Eliminierung eines Biofilms bei 37 °C

Acht bereits etablierte *P. aeruginosa*-Biofilme wurden bei 37 °C mit einem Phagencocktail aus den beiden Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 inkubiert und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten (6 h, 24 h) die Biofilmmasse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Biofilmmasse im Vergleich zur Mediumkontrolle (100%, schwarze Linie).

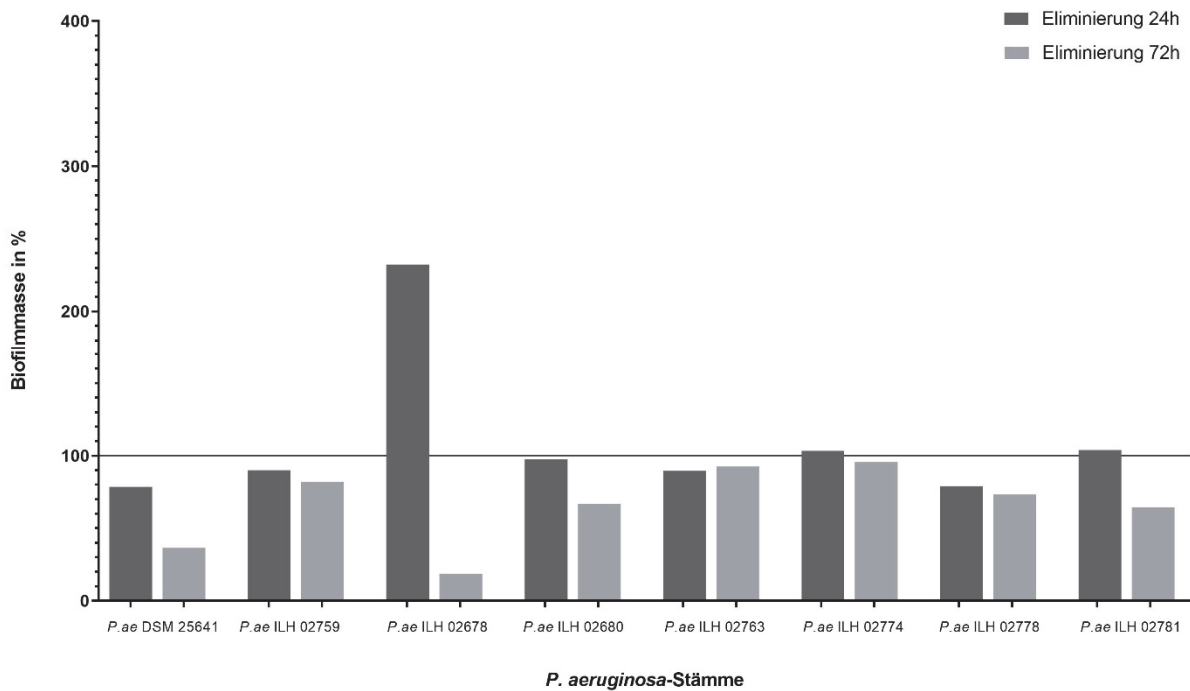


Abbildung 18: Eliminierung eines Biofilms bei 12 °C

Acht bereits etablierte *P.aeruginosa*-Biofilme wurden bei 12 °C mit einem Phagencocktail aus den beiden Phagen vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 inkubiert und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24 h, 72 h) die Biofilmmasse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Biofilmmasse im Vergleich zur Mediumkontrolle (100%, schwarze Linie).

Bei Bekämpfung des Biofilms bei einer Temperatur von 12 °C war zunächst auffällig, dass die OD-Werte deutlich über den bei der Prävention eines Biofilms ermittelten OD-Werten lagen. Dies lässt sich einfach mit der längeren Inkubationszeit erklären, da die Generationszeit bei der Temperatur von 12 °C deutlich geringer ist. Dies macht sich auch in der Biofilmformation bemerkbar, die ihr Maximum Tage später erreicht als bei Optimaltemperaturen (Morimatsu et al. 2012).

Des Weiteren waren bei der Biofilm-Bekämpfung bei 12 °C über den Zeitraum von 24 h nur bei den *P. aeruginosa*-Stämmen DSM 25641, ILH 02763 und ILH 02778 statistisch signifikante Reduktionen der Biofilmmasse erkennbar (Abbildung 18). Nach 72 h hingegen waren alle Stämme bei Inkubation mit dem Cocktail in der Biofilmmasse reduziert, davon fünf statistisch signifikant. Vergleicht man hier wieder die Werte von 24 h und 72 h, so wird deutlich, dass eine tatsächliche Reduktion nur bei *P. aeruginosa* ILH 02678 vorliegt, während bei den *P. aeruginosa*-Stämmen DSM 25641, ILH 02680, ILH 02778 und ILH 02781 die bereits bestehende Biofilmmasse erhalten bleibt und nur die der Mediumkontrolle zunimmt. *P. aeruginosa* können innerhalb von Biofilmen ihre Wachstumsrate reduzieren, um so einer Infektion durch die Phagen vorzubeugen (Testa et al. 2019), was diesen Effekt auslösen könnte. Zusätzlich sind bei allen Stämmen auch Parallelen zum Wachstum bei Inkubation mit dem Phagencocktail in Flüssigmedium zu erkennen, sodass eine Lyse der Bakterien bzw. ein

verzögertes Wachstum durch direkten Phageneinfluss die ausbleibende Zunahme der Biofilmmasse verstärkt.

Die *P. aeruginosa*-Stämme ILH 02763 und ILH 02774 zeigten bei 12 °C nur eine sehr geringe Beeinflussung der Biofilmmasse durch den Phagencocktail, obwohl insbesondere *P. aeruginosa* ILH 02774 in Flüssigmedium durch den Phagencocktail stark reduziert worden war. Da bei 12 °C keine Spot Assays durchgeführt wurden, lässt sich keine Aussage zur Resistenzentwicklung treffen. Es ist aber möglich, dass bei diesen Stämmen die Biofilme bei 12 °C besser gegen das Eindringen der Phagen geschützt sind als bei 37 °C. Außerdem ist beschrieben, dass eine veränderte Genexpression nicht nur bei unterschiedlichen Temperaturen vorliegen kann, sondern auch Unterschiede zwischen planktonischen Zellen und solchen, die in Biofilme verankert sind, bestehen (Kim et al. 2020). Da Biofilme eine Überlebensstrategie der Bakterien darstellen und 12 °C deutlich unter dem Temperaturoptimum von *P. aeruginosa* liegt, kann hier eine verstärkte und protektivere Biofilmbildung die Folge sein (Kim et al. 2020). Des Weiteren ist beschrieben, dass bei niedrigeren Temperaturen nicht nur die Aktivität von *Pseudomonas* spp. reduziert ist, sondern auch die Viskosität der EPS abnimmt (Morimatsu et al. 2012), was ebenfalls eine stärkere Barriere gegen Bakteriophagen darstellen kann und zudem die Wahrscheinlichkeit eines Detachment der Biofilme reduziert. Möglicherweise ändert sich nicht nur die Viskosität, sondern auch die Zusammensetzung der EPS, was die Unterschiede zwischen den Stämmen erklären würde.

Bei Auswertung der Spot Assays aus der Biofilmbekämpfung bei 37 °C ließ sich bei sechs *P. aeruginosa*-Stämmen ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an resistenten Klonen und Ausprägung der Biofilmmasse erkennen. Die *P. aeruginosa*-Stämme ILH 02678, ILH 02774 und ILH 02781 wiesen nach 6 h nur geringe Biofilmmassen sowie eine Resistenz gegenüber dem Cocktail von maximal 23 % der Klone auf, nach 24 h waren die Biofilmmassen deutlich stärker ausgeprägt bei Resistenzen gegenüber dem Cocktail von mindestens 60 % der Klone. Auch bei *P. aeruginosa* ILH 02680 stieg die Anzahl der resistenten Klone auf 100 % bei stärkerer Ausprägung der Biofilmmasse an, jedoch waren bereits nach 6 h bei einer sehr geringen Biofilmmasse 78 % der Klone nicht durch den Cocktail lysierbar. Eine Therapie mit Bakteriophagen führt aber so gut wie nie zur absoluten Auslöschung der Bakterien, sondern resistente Klone setzen sich mit der Zeit durch (Markwitz et al. 2021), was in Flüssigmedium bei den genannten Stämmen bis auf *P. aeruginosa* ILH 02678 ebenfalls nach spätestens 6 h zu beobachten war. Zu beachten ist zudem, dass die Klone aus dem Überstand gewonnen wurden und deshalb resistente planktonische Zellen auftreten können, bevor sie sich in Biofilme formieren.

Bei dem *P. aeruginosa*-Stämmen DSM 25641 war der Biofilm durch die Cocktailzugabe sowohl nach 6 h als auch nach 24 h deutlich reduziert und es konnten kaum Klone gewonnen und bei diesen keine resistenten Klone nachgewiesen werden. Bei den *P. aeruginosa*-Stämmen ILH 02778 und ILH 02759 war die Biofilmmasse nicht durch den Cocktail reduziert und der Anteil der resistenten Klone lag bei 0 - 9 % bzw. 100 % der Klone. Bei *P. aeruginosa* ILH 02778 war somit kein Zusammenhang zwischen ausbleibender Biofilmreduktion und Resistenz der Klone feststellbar. Auch in Flüssigmedium hatte der Phagencocktail vergleichbar wenig Einfluss auf die Zellzahl gehabt. Es gibt jedoch auch weitere Ursachen, warum ein Phagencocktail nicht in der Lage sein kann, Biofilme zu beseitigen. Eine Erklärung kann sein, dass der Cocktail bei *P. aeruginosa* ILH 02778 nicht in der Lage ist, die EPS zu lysieren und deshalb nicht bis zu den Bakterien durchdringt. Auch ist es möglich, wenn auch nicht wahrscheinlich, dass die Zeitpunkte von 6 h und 24 h bei diesem Stamm falsch gewählt sind (Abedon et al. 2021). Auch der *P. aeruginosa*-Stamm ILH 02763 zeigte nach 24 h bei im Vergleich zur Mediumkontrolle stärker ausgeprägtem Biofilm einen geringeren Anteil von 0 % gegenüber dem Cocktail resistenter Klone, während der im Vergleich zur Mediumkontrolle reduzierte Biofilm nach 6 h über einen Anteil von 18 % resistenter Klone verfügte. Auch hier ist es möglich, dass resistente Klone aufkommen, bevor sie schließlich den Biofilm bilden, was aber nicht den Anteil von 100 % sensiblen Klonen nach 24 h erklärt. Zwar gibt es verschiedenen Studien, die das Aufkommen von sensiblen Klonen in Biofilmen beschreiben (Markwitz et al. 2021; Simmons et al. 2020), jedoch immer bei gleichzeitigem Vorhandensein resistenter Klone, was das hier beobachtete Phänomen nicht vollständig erklärt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der angewendete Cocktail auch in der Bekämpfung von Biofilmen bei 37 °C erfolgversprechend ist, allerdings nicht über 6 h hinaus. Bei 12 °C hingegen tritt der beobachtete reduzierende Effekt erst zwischen 24 h und 72 h auf, sodass er nahezu keine praktische Relevanz hat. Weiterführende Untersuchungen zu einer Kombinationstherapie beispielsweise mit Chlor oder eine Erweiterung des Phagencocktails wären von Interesse.

### 5.5. Genomsequenzierung und Bioinformatische Auswertung

Die unterschiedlichen Phänotypen der aus der Zellzahlreduktion bei 37 °C gewonnenen *P. aeruginosa*-Klone wurden exemplarisch anhand einzelner Vertreter der entsprechenden Kombinationen aus Resistenzmuster und Koloniefarbe einer Genomsequenzierung unterzogen. Im Abgleich mit den vorhandenen 31 der 44 Gene, die bekannt für Mutationen bei Phagenresistenzen sind oder für bereits erforschte Phagenrezeptoren codieren (Vaitekenas et al. 2021; Marko et al. 2018; Rocchetta et al. 1999), konnte kein Zusammenhang zwischen einer Resistenz gegenüber einem der Phagen und einer Mutation gefunden werden. Auffällig

war jedoch, dass bei allen rot wachsenden Klonen das Gen *hmgA* fehlte oder im Falle eines Klons von *P. aeruginosa* ILH 02781 eine Punktmutation aufwies. Das Gen *hmgA* codiert für die Homogentisat-1,2-dioxygenase, deren Fehlen wiederum führt zu einer Akkumulation der Homogentisinsäure, was die rotbraune Farbe der Kolonien bedingen kann. Zusätzlich fehlte bei *P. aeruginosa* ILH 02781 auch das benachbarte Gen *galU*, welches am Glucosestoffwechsel beteiligt ist und vermutlich Einfluss auf das Vorhandensein von O-Antigenen hat (Le et al. 2014). In anderen Studien führte das Fehlen des Gens *galU* zu Resistenzen gegenüber den eingesetzten Phagen, was hier jedoch nicht der Fall war.

Bei dem per GeneiousPrime durchgeführten Genomabgleich der sieben sensiblen Wildstämme gegen ihre resistenten Klone wurden ebenfalls keine Gendeletionen gefunden, die eine Phagenresistenz gegenüber einem der beiden Phagen erklären. Eine Mutation hingegen kann nicht ausgeschlossen werden, da die Gene lediglich auf ihr Vorhandensein und ihre übereinstimmende Länge hin überprüft wurden. Allerdings können Punktmutationen in Rezeptorgenen ausreichen, damit Bakterien eine vollständige Resistenz gegenüber Phagen entwickeln (Egido et al. 2021).

Resistenzen gegenüber Bakteriophagen müssen allerdings nicht immer genetisch bedingt sein, auch phänotypische Resistenzen sind beschrieben. Ein Herunterregulieren von Rezeptorgenen oder deren Maskieren reicht aus, um die Adsorptionsrate der Bakteriophagen deutlich zu reduzieren. Diese Variation der Genexpression könnte bereits intrinsisch bei einzelnen Individuen innerhalb der Bakterienpopulation vorhanden sein, oder durch Abbauprodukte getöteter Bakterien sowie Stress induziert werden. Eine weitere Hypothese ist, dass Phagenproteine aus den bereits lysierten Bakterienzellen Rezeptoren blockieren, die für eine Adsorption nötig sind (Bull et al. 2014). Typisch für eine solche phänotypische Resistenz ist ein schnelles Absinken der Bakterienzahl nach Zugabe der Phagen, gefolgt von einer Erholung der noch immer vorrangig sensiblen Bakterienpopulation bei einer gleichzeitig hohen CFU/ml, wie es auch in diesen Experimenten zu beobachten war. Als weitere Ursache für eine nicht genetische Resistenz ist beschrieben, dass Bakterien im Ruhezustand gegen angreifende Bakteriophagen resistent sind. Jedoch scheint dies nur auf lysogene Phagen zuzutreffen, nicht aber auf lytische Phagen, wie vB\_Pae-TbilisiM32 und vB\_Pae-CS2310 es sind (Perleth et al. 2019; Pearl et al. 2008).

Phänotypische Resistenz ist ein Phänomen, welches vorrangig in Flüssigmedium auftritt (Bull et al. 2014). Es ist deshalb nicht überraschend, dass die Klone im Spot Assay weiterhin sensibel gegenüber beiden Phagen sind. Die Klone aus den Biofilmen jedoch waren keiner Genanalyse unterzogen worden, da ähnliche Mechanismen wie bei der Zellzahlreduktion vermutet worden waren. Ob hier also genetische oder phänotypische Resistenzen bzw. Kombinationen aus beiden vorliegen, kann nur vermutet werden. Attrill et al. beschreiben hierzu, dass durch den räumlichen Zusammenhalt in Biofilmen verstärkt phänotypische

Resistenzen eine Rolle spielen (Attrill et al. 2021). Dies steht jedoch im direkten Widerspruch zu Bull et al., und das Auftreten von sensiblen Klonen in Biofilmen wird in weiteren Studien durch andere Mechanismen erklärt, die in diesem Zusammenhang eher von Bedeutung sind. Es gibt beispielsweise auch theoretische Modelle, die alle Interaktionsdynamiken zwischen Bakterien und Phagen einbeziehen und daraus eine Koexistenz von gegenüber Phagen sensiblen und resistenten Bakterien als Ergebnis ermitteln, da die resistenten Bakterien bedingt durch Fitnessseinbußen langsamer wachsen als die sensiblen, diese aber gegen Phageneinflüsse abschirmen können (Simmons et al. 2020). Zudem scheint die Zugabe von Bakteriophagen die Heterogenität der Klone in Biofilmen zu verstärken, was auch die hohe Variabilität an Resistenzmustern erklärt. Solch eine stark ausgeprägte Heterogenität beinhaltet auch Klone, die weiter über das Phagenprofil des Wildstammes verfügen und somit sensibel gegenüber den applizierten Phagen bleiben (Markwitz et al. 2021).

## 6. Zusammenfassung

Bekämpfung von *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen mithilfe von Bakteriophagen.

Ziel dieser Arbeit war es zu analysieren, ob mit einem Phagencocktail aus den beiden Bakteriophagen vB\_Pae-TbilisM32 und vB\_Pae-CS2310 einer Entstehung von *P. aeruginosa*-Biofilmen vorzubeugen ist, sowie bereits etablierte Biofilme beseitigt werden können. Die Experimente wurden sowohl bei dem *P. aeruginosa*-Temperaturoptimum von 37 °C durchgeführt, als auch bei 12 °C, was die Bedingungen in lebensmittelverarbeitenden Betrieben abbilden sollte.

Zunächst wurde das Wirtsspektrum der Phagen ermittelt, welches für vB\_Pae-TbilisM32 bei 53 % der untersuchten *P. aeruginosa*-Wildstämme lag und für vB\_Pae-CS2310 bei 80 %.

Für die weiteren Untersuchungen wurden sechs gegenüber beiden Phagen sensible Stämme ausgewählt, mit denen zunächst in Flüssigmedium der Einfluss beider Phagen sowie des Cocktails auf die Zellzahl bei 37 °C untersucht wurde. Dabei wurde eine rasante Reduktion, gefolgt von einer schnellen Erholung der Zellzahl beobachtet. Bei 12 °C konnte durch Zugabe des Phagencocktails ebenfalls eine Reduktion der Zellzahl erreicht oder zumindest deren Ansteigen verhindert werden.

Die Prävention der *P. aeruginosa*-Biofilmbildung erwies sich sowohl bei 37 °C als auch bei 12 °C als äußerst erfolgreich, lediglich bei 37 °C waren zwei der Stämme nicht durch den Cocktail beeinflusst. Die Bekämpfung der etablierten *P. aeruginosa*-Biofilme hingegen verlief nach unterschiedlichen Mustern. Während bei 37 °C nach 6 h eine deutliche Reduktion zu erkennen war, waren nach 24 h bereits wieder hohe optische Dichten zu messen, die zumeist sogar über der Vergleichskontrolle lagen. Bei 12 °C hingegen war nach 72 h eine stärkere Reduktion der Biofilmmasse zu erkennen als nach 24 h.

Die am Ende der Versuche gewonnene *P. aeruginosa*-Klone waren trotz des Überlebens in Co-Kultur mit den Bakteriophagen häufig weiterhin sensibel gegenüber den Phagen. Bei der anschließend durchgeführten Genanalyse konnten keine Hinweise auf eine den Resistenzen zugrundeliegende Genveränderung gefunden werden. Da jedoch bis auf die 31 genauer untersuchten Gene nur nach vollständigen Gendeletionen gesucht wurde, kann eine Resistenz aufgrund einer Mutation in anderen Genen nicht ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen, die mögliche Mutationen mit einbeziehen, sind anzustreben.

Daneben kommen allerdings auch phänotypische Resistenzen als Ursache infrage. Durch veränderte Genexpression und damit einhergehender Maskierung oder reduzierter Ausbildung der Phagenrezeptoren setzt einige Zeit nach Phagenzugabe ein Anstieg der Zellzahl ein, die

Bakterien bleiben aber weiterhin sensibel gegenüber den eingesetzten Phagen. Die verschiedenen aufgetretenen Resistenzmuster lassen sich auch durch das Forcieren der bakteriellen Heterogenität bei Zugabe von Bakteriophagen erklären.

Für eine Applikation *in vivo* sollte der hier untersuchte Bakteriophagencocktail noch weiter verbessert werden. Zwar ist er in der Prävention von *P. aeruginosa*-Biofilmen schon sehr erfolgversprechend, jedoch entwickeln sich sowohl in Flüssigmedium als auch in einer Biofilmbildung schon nach kurzer Zeit Resistenzen. Eine Erweiterung des Cocktails um zusätzliche *P. aeruginosa*-Phagen sowie eine Kombinationstherapie mit Chemikalien wie Chlor wäre ebenfalls anzustreben. Zudem sollten die Zielrezeptoren der eingesetzten Phagen weiterhin gesucht und das zugrundeliegende Resistenzmuster in weiterführenden Studien vollständig abgeklärt werden.

Auch wäre von Interesse, ob die Resistenzen gegen den Phagencocktail die Virulenz von *P. aeruginosa* reduzieren, was einen therapeutischen Einsatz trotz der Resistenzen in medizinischen Bereichen ermöglichen könnte.



## 7. Summary

Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using bacteriophages.

The aim of this study was to analyse if a cocktail of the two bacteriophages vB\_Pae-TbilisiM32 and vB\_Pa-CS2310 is able to prevent the formation of a *P. aeruginosa* biofilm as well as to eliminate an already established biofilm. The experiments were carried out at the optimum temperature of *P. aeruginosa*, 37 °C, and at 12 °C, to represent the conditions in the food processing industry.

At first, the host range of both phages was determined, resulting in 53 % of the examined *P. aeruginosa* wild-type strains in vB\_Pae-TbilisiM32 and 80 % in vB\_Pae-CS2310.

Following this, six of these *P. aeruginosa* strains were chosen, all of which were sensitive to both phages. With these strains, the influence of the two phages and a cocktail of both was tested in liquid culture at 37 °C. Rapid reduction of the bacterial number was observed, followed by fast cell count recovery. At 12 °C, the cocktail was also able to reduce the cell count, or at least to prohibit an increase of the cell count in some strains.

Prevention of *P. aeruginosa* biofilm formation was successful at both 37 °C and 12 °C. Only two strains weren't affected by the cocktail at 37 °C. However, the elimination of the established biofilms wasn't consistent. After 6 h at 37 °C a distinct reduction of the biofilms could be observed, while after 24 h strong biofilm masses occurred again, with optical densities above the media control. By contrast, the progression at 12 °C showed a stronger reduction of the biofilm masses after 72 h than after 24 h.

At the end of the experiments, clones were obtained, and even when they survived in co-culture with the bacteriophages, plenty of them remained sensible to the used phages and cocktail. The genetic analyses of the bacterial strains did not result in any evidence of genetic change causing resistances. However, apart from the 31 selected genes, only complete gene deletions were investigated, which means that mutations in other genes remain possible. Further investigations regarding the mutations are necessary.

Apart from that, phenotypic resistances may also cause survival of bacteria. A slightly changed genetic expression may result in a different formation or masking of the phage receptors. In this case, in a short period after adding the phages, the cell count increases, but the bacteria remain sensible to the phages. Adding bacteriophages is forcing a heterogeneity of the bacteria, which explains the different resistance patterns.

To be applied *in vivo*, the phage cocktail used in this study should be advanced. Although it is already very promising in the prevention of *P. aeruginosa* biofilms, the resistances in liquid culture and already established biofilms develop in a concise period. Therefore, the cocktail should be extended by further *P. aeruginosa* phages and used in combination with other therapeutic agents like chlorine. In further studies, the binding receptor of both phages should be examined, and the causal resistance pattern should be investigated.

Furthermore, it would be interesting to investigate, if the resistance against the phage cocktail is reducing the virulence of *P. aeruginosa*. In that case, despite the resistance, a therapeutical application in medical sections would be achievable.

## 8. Literaturverzeichnis

Abedon, S. T. (2011):

Lysis from without.

Bacteriophage, 1, 46-49

Abedon, S. T. (2016):

Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI).

Bacteriophage, 6, e1220348. DOI: 10.1080/21597081.2016.1220348.

Abedon, S. T., K. M. Danis-Wlodarczyk, D. J. Wozniak and M. B. Sullivan (2021):

Improving Phage-Biofilm In Vitro Experimentation.

Viruses, 13, 1175. DOI: 10.3390/v13061175.

Ackermann, H.-W. (2011):

Bacteriophage Taxonomy.

Microbiol Aust, 32, 90-94

Ackermann, H. W. (2001):

Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review.

Arch Virol, 146, 843-857

Alves, D. R., P. Perez-Esteban, W. Kot, J. E. Bean, T. Arnot, L. H. Hansen, M. C. Enright and A. T. Jenkins (2016):

A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions.

Microb Biotechnol, 9, 61-74

Attrill, E. L., R. Claydon, U. Lapinska, M. Recker, S. Meaden, A. T. Brown, E. R. Westra, S. V. Harding and S. Pagliara (2021):

Individual bacteria in structured environments rely on phenotypic resistance to phage.

PLoS Biol, 19, e3001406. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001406.

Azam, A., A. S. Ahmed, M. Oves, M. S. Khan, S. S. Habib and A. Memic (2012):

Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study.

Int J Nanomedicine, 7, 6003-6009

Aziz, R. K., D. Bartels, A. A. Best, M. DeJongh, T. Disz, R. A. Edwards, K. Formsma, S. Gerdes, E. M. Glass, M. Kubal, F. Meyer, G. J. Olsen, R. Olson, A. L. Osterman, R. A. Overbeek, L. K. McNeil, D. Paarmann, T. Paczian, B. Parrello, G. D. Pusch, C. Reich, R. Stevens, O. Vassieva, V. Vonstein, A. Wilke and O. Zagnitko (2008):  
The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology.  
BMC Genomics, 2008, 9:75. DOI: 10.1186/1471-2164-9-75.

Barbier, M., F. H. Damron, P. Bielecki, M. Suarez-Diez, J. Puchalka, S. Alberti, V. M. Dos Santos and J. B. Goldberg (2014):  
From the environment to the host: re-wiring of the transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* from 22 degrees C to 37 degrees C.  
PLoS One, 9, e89941. DOI: 10.1371/journal.pone.0089941.

Bohannan, B. J. M. and R. E. Lenski (2000):  
Linking genetic change to community evolution: insights from studies of bacteria and bacteriophage.  
Ecol Lett, 3, 362-377

Brown, D. C., S. Johnston, P. Teevens and R. J. Turner (2016):  
Relationship Between Planktonic and Sessile Cells as they Relate to Biofilm Growth.  
In: Corrosion 2016 / Hrsg.: NACE International Corrosion Conference Proceedings  
Corrosion 2016, Vancouver, British Columbia, Canada, Paper No. 7571

Bruno, T. F., D. E. Woods and C. H. Mody (2000):  
Exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis in T lymphocytes.  
J Leukoc Biol, 67, 808-816

Bull, J. J., C. S. Vegge, M. Schmerer, W. N. Chaudhry and B. R. Levin (2014):  
Phenotypic resistance and the dynamics of bacterial escape from phage control.  
PLoS One, 9, e94690. DOI: 10.1371/journal.pone.0094690.

Campbell, P. L. (2019):  
Assembly and Structure of Bacteriophage Capsids and Tails.  
Doctor of Philosophy, verteidigt am 25.07.2019, University of Pittsburgh.

Cappitelli, F., A. Pol and F. Villa (2014):

Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled.

Food Eng Rev, 6, 29-42

Chaudhry, W. N., J. Concepcion-Acevedo, T. Park, S. Andleeb, J. J. Bull and B. R. Levin (2017):

Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms.

PLoS One, 12, e0168615. DOI: 10.1371/journal.pone.0168615.

Chen, X. and P. S. Stewart (2000):

Biofilm Removal caused by Chemical Treatments.

Water Research, 34, 4229-4233

Chibani, C. M., A. Farr, S. Klama, S. Dietrich and H. Liesegang (2019):

Classifying the Unclassified: A Phage Classification Method.

Viruses, 11, 195. DOI: 10.3390/v11020195.

Debarbieux, L., D. Leduc, D. Maura, E. Morello, A. Criscuolo, O. Grossi, V. Balloy and L. Touqui (2010):

Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections.

J Infect Dis, 201, 1096-1104

Della Salla, G., R. Teta, G. Esposito and C. V. (2019):

The Chemical Language of Gram-Negative Bacteria.

In: Quorum Sensing: Molecular Mechanism and Biotechnological Application / Hrsg.: G.

Tommonaro, 1. Auflage, S. 3-28.

London: Academic Press, ISBN 978-0-12-814905-8

Dettman, J. R., J. L. Sztepanacz and R. Kassen (2016):

The properties of spontaneous mutations in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*.

BMC Genomics, 2016, 17:27. DOI: 10.1186/s12864-015-2244-3.

Döring, G. (1987):

Die Bedeutung der Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa* für akute und chronische *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen.

Infection, 15, 38-41

Egido, J. E., A. R. Costa, C. Aparicio-Maldonado, P. J. Haas and S. J. J. Brouns (2021):

Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance.

FEMS Microbiol Rev, 2021, fuab048. DOI: 10.1093/femsre/fuab048.

EliavaBiopreparations (1923):

Intesti Bacteriophage.

Abgerufen am: 17.11.2021 um 15:27 Uhr, von <http://phage.ge/products/intesti-bacteriophage/>

Eriksen, R. S., S. L. Svenningsen, K. Sneppen and N. Mitarai (2018):

A growing microcolony can survive and support persistent propagation of virulent phages.

Proc Natl Acad Sci U S A, 115, 337-342

EU-Parlament and EU-Ministerrat (2004):

Verordnung (EG) Nr. 852/2004 vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene.

Abgerufen am: 18.11.2021 um 12:29 Uhr, von <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:de:PDF>

Favero, M. S., L. A. Carson, W. W. Bond and N. J. Petersen (1971):

*Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals.

Science, 173, 836-838

Forti, F., D. R. Roach, M. Cafora, M. E. Pasini, D. S. Horner, E. V. Fiscarelli, M. Rossitto, L. Cariani, F. Briani, L. Debarbieux and D. Ghisotti (2018):

Design of a Broad-Range Bacteriophage Cocktail That Reduces *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and Treats Acute Infections in Two Animal Models.

Antimicrob Agents Chemother, 62, 62:e02573-02517. DOI: 10.1128/AAC.02573-17.

Fu, W., T. Forster, O. Mayer, J. J. Curtin, S. M. Lehman and R. M. Donlan (2010):

Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system.

Antimicrob Agents Chemother, 54, 397-404

Galie, S., C. Garcia-Gutierrez, E. M. Miguelez, C. J. Villar and F. Lombo (2018):  
Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods.  
Front Microbiol, 9, Article 898. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00898.

Gonzalez-Huici, V., M. Salas and J. M. Hermoso (2004):  
The push-pull mechanism of bacteriophage O29 DNA injection.  
Mol Microbiol, 52, 529-540

Grekov, I., J. G. Thoming, A. Kordes and S. Haussler (2021):  
Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* toward higher fitness under standard laboratory  
conditions.  
ISME J, 15, 1165-1177

Hall, S., C. McDermott, S. Anoopkumar-Dukie, A. J. McFarland, A. Forbes, A. V. Perkins, A.  
K. Davey, R. Chess-Williams, M. J. Kiefel, D. Arora and G. D. Grant (2016):  
Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*.  
Toxins (Basel), 8, 236. DOI: 10.3390/toxins8080236.

Han, Z. and H. L. Smith (2012):  
Bacteriophage-resistant and bacteriophage-sensitive bacteria in a chemostat.  
Math Biosci Eng, 9, 737-765

Hatfull, G. F. and R. W. Hendrix (2011):  
Bacteriophages and their genomes.  
Curr Opin Virol, 1, 298-303

Hawkins, C., D. Harper, D. Burch, E. Anggard and J. Soothill (2010):  
Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a  
before/after clinical trial.  
Vet Microbiol, 146, 309-313

Heeb, S. and D. Haas (2001):  
Regulatory Roles of the GacS/GacA Two-Component System in Plant-Associated and Other  
Gram-Negative Bacteria.  
Molecular Plant-Microbe Interactions, 14, 1351–1363

Heilmann, S., K. Sneppen and S. Krishna (2012):

Coexistence of phage and bacteria on the boundary of self-organized refuges.

Proc Natl Acad Sci U S A, 109, 12828-12833

Heller, K. J., L. Fieseler and M. J. Loessner (2011):

Bakteriophagen: Grundlagen, Rolle in Lebensmitteln und Anwendungen zum Nachweis sowie der Kontrolle von Krankheitserregern.

1. Auflage, Hamburg: Behr's Verlag

ISBN 978-3-89947-594-4

Horn, D. (2020):

Mit Bakteriophagen gegen Listerien - helfen uns Bakteriophagen bei der Lösung des Problems?

Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung, 3/2020, 82-84

Hosseinidoust, Z., N. Tufenkji and T. G. van de Ven (2013):

Formation of biofilms under phage predation: considerations concerning a biofilm increase.

Biofouling, 29, 457-468

Jamal, M., W. Ahmad, S. Andleeb, F. Jalil, M. Imran, M. A. Nawaz, T. Hussain, M. Ali, M.

Rafiq and M. A. Kamil (2018):

Bacterial biofilm and associated infections.

J Chin Med Assoc, 81, 7-11

Jo, J., A. Price-Whelan and L. E. Dietrich (2014):

An aerobic exercise: defining the roles of *Pseudomonas aeruginosa* terminal oxidases.

J Bacteriol, 196, 4203-4205

Kanematsu, H. and D. M. Barry (2020):

Formation and Control of Biofilm in Various Environments.

1. Auflage, Singapore: Springer Nature

ISBN 978-981-15-2240-6

Kim, S., X. H. Li, H. J. Hwang and J. H. Lee (2020):

Thermoregulation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation.

Appl Environ Microbiol, 86, 86:e01584-01520. DOI: 10.1128/AEM.01584-20.



Kim, S. K. and J. H. Lee (2016):

Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*.

J Microbiol, 54, 71-85

Klockgether, J., N. Cramer, L. Wiehlmann, C. F. Davenport and B. Tummeler (2011):

*Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity.

Front Microbiol, 2, Article 150. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00150.

Kwiatek, M., S. Parasion and A. Nakonieczna (2020):

Therapeutic bacteriophages as a rescue treatment for drug-resistant infections - an in vivo studies overview.

J Appl Microbiol, 128, 985-1002

La Rosa, R., E. Rossi, A. M. Feist, H. K. Johansen and S. Molin (2021):

Compensatory evolution of *Pseudomonas aeruginosa*'s slow growth phenotype suggests mechanisms of adaptation in cystic fibrosis.

Nat Commun, 12, (2021) 2012:3186. DOI: 10.1038/s41467-021-23451-y.

LaBauve, A. E. and M. J. Wargo (2012):

Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*.

Curr Protoc Microbiol, Chapter 6, 25:26E.21.21-26E.21.28. DOI:

10.1002/9780471729259.mc06e01s25.

Labrie, S. J., J. E. Samson and S. Moineau (2010):

Bacteriophage resistance mechanisms.

Nat Rev Microbiol, 8, 317-327

Lacqua, A., O. Wanner, T. Colangelo, M. G. Martinotti and P. Landini (2006):

Emergence of biofilm-forming subpopulations upon exposure of *Escherichia coli* to environmental bacteriophages.

Appl Environ Microbiol, 72, 956-959

Lapchin, L. and T. Guillemaud (2005):

Asymmetry in host and parasitoid diffuse coevolution: when the red queen has to keep a finger in more than one pie.

Front Zool, 2005, 2:4. DOI: 10.1186/1742-9994-2-4.

- Latino, L., C. Essoh, Y. Blouin, H. Vu Thien and C. Pourcel (2014):  
A novel *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage, Ab31, a chimera formed from temperate phage PAJU2 and *P. putida* lytic phage AF: characteristics and mechanism of bacterial resistance.  
PLoS One, 9, e93777. DOI: 10.1371/journal.pone.0093777.
- Le, S., X. Yao, S. Lu, Y. Tan, X. Rao, M. Li, X. Jin, J. Wang, Y. Zhao, N. C. Wu, R. Lux, X. He, W. Shi and F. Hu (2014):  
Chromosomal DNA deletion confers phage resistance to *Pseudomonas aeruginosa*.  
Sci Rep, 4, 4 : 4738. DOI: 10.1038/srep04738.
- Liu, J., R. Yan, Q. Zhong, S. Ngo, N. J. Bangayan, L. Nguyen, T. Lui, M. Liu, M. C. Erfe, N. Craft, S. Tomida and H. Li (2015):  
The diversity and host interactions of *Propionibacterium acnes* bacteriophages on human skin.  
ISME J, 9, 2078-2093
- Maghsoodi, A., A. Chatterjee, I. Andricioaei and N. C. Perkins (2019):  
How the phage T4 injection machinery works including energetics, forces, and dynamic pathway.  
Proc Natl Acad Sci U S A, 116, 25097-25105
- Mangalea, M. R. and B. A. Duerkop (2020):  
Fitness trade-offs resulting from bacteriophage resistance potentiate synergistic antibacterial strategies.  
Infect Immun, 2020, 1-45. DOI: 10.1128/IAI.00926-19.
- Marko, V. A., S. L. N. Kilmury, L. T. MacNeil and L. L. Burrows (2018):  
*Pseudomonas aeruginosa* type IV minor pilins and PilY1 regulate virulence by modulating FimS-AlgR activity.  
PLoS Pathog, 14, e1007074. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007074.
- Markwitz, P., T. Olszak, G. Gula, M. Kowalska, M. Arabski and Z. Drulis-Kawa (2021):  
Emerging Phage Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Is Accompanied by an Enhanced Heterogeneity and Reduced Virulence.  
Viruses, 13, 1332. DOI: 10.3390/v13071332.

McVay, C. S., M. Velasquez and J. A. Fralick (2007):

Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model.  
Antimicrob Agents Chemother, 51, 1934-1938

Meliani, A. and A. Bensoltane (2015):

Review of *Pseudomonas* Attachment and Biofilm Formation in Food Industry.  
Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences, 3, 1000126. DOI: 10.4172/2375-446X.1000126.

Mirzaei, M. K. and A. S. Nilsson (2015):

Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating  
Analyses for Determination of Host Range and Efficacy.  
PLoS ONE, 10 (3), e0118557. DOI: 10.1371/journal.pone.0118557.

Morimatsu, K., K. Eguchi, D. Hamanaka, F. Tanaka and T. Uchino (2012):

Effects of Temperature and Nutrient Conditions on Biofilm Formation of *Pseudomonas  
putida*.  
Food Science and Technology Research, 18, 879-883

Nobrega, F. L., M. Vlot, P. A. de Jonge, L. L. Dreesens, H. J. E. Beaumont, R. Lavigne, B. E.  
Dutilh and S. J. J. Brouns (2018):

Targeting mechanisms of tailed bacteriophages.  
Nat Rev Microbiol, 16, 760-773

Nouraldin, A. A. M., M. M. Baddour, R. A. H. Harfoush and S. A. M. Essa (2016):

Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical  
isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.  
Alexandria Journal of Medicine, 52, 99-105

Oechslin, F. (2018):

Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy.  
Viruses, 10, 351. DOI: 10.3390/v10070351.

Orlandi, V. T., F. Bolognese, L. Chiodaroli, T. Tolker-Nielsen and P. Barbieri (2015):

Pigments influence the tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to photodynamically  
induced oxidative stress.  
Microbiology, 161, 2298-2309

Pearl, S., C. Gabay, R. Kishony, A. Oppenheim and N. Q. Balaban (2008):  
Nongenetic individuality in the host-phage interaction.  
PLoS Biol, 6, 0957-0964

Perleth, J., T. Alter, S. Orquera, G. Gölz, C. Rohde, M. Rohde, C. Jäckel, S. Schrehle and J. Hammerl (2019):  
vB\_Pae\_CS2310 – Ein neuer Phage zur Bekämpfung von *Pseudomonas aeruginosa*?  
In: 60. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz /  
Hrsg.: Verlag der DVG Service GmbH  
60. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz,  
Garmisch-Partenkirchen 24.-27. September 2019, 319-320  
ISBN 978-3-86345-492-0

PhageTherapyCenter (2004):  
Phage Therapy Center.  
Abgerufen am: 16.11.2021 um 15:08 Uhr, von  
[https://www.phagetherapycenter.com/pii/PatientServlet?command=static\\_home](https://www.phagetherapycenter.com/pii/PatientServlet?command=static_home)

Pires, D. P., L. D. R. Melo and J. Azeredo (2021):  
Understanding the Complex Phage-Host Interactions in Biofilm Communities.  
Annu Rev Virol, 8, 73-94

Pyzik, E., R. P. Radzki and R. Urban-Chmiel (2021):  
Experimental Phage Therapies in Companion Animals with A Historical Review.  
Curr Rev Clin Exp Pharmacol, 16, 17-29

Rai, M., A. P. Ingle, S. Gaikwad, I. Gupta, A. Gade and S. Silverio da Silva (2016):  
Nanotechnology based anti-infectives to fight microbial intrusions.  
J Appl Microbiol, 120, 527-542

Rasamiravaka, T., Q. Labtani, P. Duez and M. Jaziri (2015):  
The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and  
Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms.  
BioMed Research International, 2015, Article ID 759348. DOI:  
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/759348>.

Raspaud, E., T. Forth, C. Sao-Jose, P. Tavares and M. de Frutos (2007):  
A kinetic analysis of DNA ejection from tailed phages revealing the prerequisite activation energy.

Biophys J, 93, 3999-4005

Rocchetta, H. L., L. L. Burrows and J. S. Lam (1999):  
Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*.

Microbiol Mol Biol Rev, 63, 523-553

Samson, J. E., A. H. Magadan, M. Sabri and S. Moineau (2013):

Revenge of the phages: defeating bacterial defences.

Nat Rev Microbiol, 11, 675-687

Sauer, K. (2018):

Biofilme - tödlich wie Krebs?

Abgerufen am: 26.11.2021 um 10:09 Uhr, von <https://www.spektrum.de/news/biofilme-toedlich-wie-krebs/1554198>

Schuch, R., B. K. Khan, A. Raz, J. A. Rotolo and M. Wittekind (2017):

Bacteriophage Lysin CF-301, a Potent Antistaphylococcal Biofilm Agent.

Antimicrob Agents Chemother, 61, e02666-02616. DOI: 10.1128/AAC.02666-16.

Seed, K. D. (2015):

Battling Phages: How Bacteria Defend against Viral Attack.

PLoS Pathog, 11, e1004847. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004847.

Sharma, K. and A. Pagedar Singh (2018):

Antibiofilm Effect of DNase against Single and Mixed Species Biofilm.

Foods, 7, 42. DOI: 10.3390/foods7030042.

Sharma, S., S. Chatterjee, S. Datta, R. Prasad, D. Dubey, R. K. Prasad and M. G. Vairale (2017):

Bacteriophages and its applications: an overview.

Folia Microbiol (Praha), 62, 17-55

Simmons, E. L., M. C. Bond, B. Koskella, K. Drescher, V. Bucci and C. D. Nadell (2020):  
Biofilm Structure Promotes Coexistence of Phage-Resistant and Phage-Susceptible  
Bacteria.

mSystems, 5, e00877-00819. DOI: 10.1128/mSystems.00877-19.

Soukarieh, F., P. Williams, M. J. Stocks and M. Camara (2018):  
*Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems as Drug Discovery Targets: Current  
Position and Future Perspectives.

J Med Chem, 61, 10385-10402

Spencer, D. H., A. Kas, E. E. Smith, C. K. Raymond, E. H. Sims, M. Hastings, J. L. Burns, R.  
Kaul and M. V. Olson (2003):

Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

J Bacteriol, 185, 1316-1325

Stellato, G., D. R. Utter, A. Voorhis, M. De Angelis, A. M. Eren and D. Ercolini (2017):  
A Few *Pseudomonas* Oligotypes Dominate in the Meat and Dairy Processing Environment.

Front Microbiol, 8, Article 264. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00264.

Strotskaya, A., E. Savitskaya, A. Metlitskaya, N. Morozova, K. A. Datsenko, E. Semenova  
and K. Severinov (2017):

The action of *Escherichia coli* CRISPR-Cas system on lytic bacteriophages with different  
lifestyles and development strategies.

Nucleic Acids Res, 45, 1946-1957

Testa, S., S. Berger, P. Piccardi, F. Oechslin, G. Resch and S. Mitri (2019):

Spatial structure affects phage efficacy in infecting dual-strain biofilms of *Pseudomonas  
aeruginosa*.

Commun Biol, 2, (2019) 2012:2405. DOI: 10.1038/s42003-019-0633-x.

Therapy, I. o. I. a. E. (2005):

Basic rules of the experimental Phage therapy at PTU.

Abgerufen am: 30.03.2021 um 10:06 Uhr, von

<https://www.iitd.pan.wroc.pl/en/OTF/ZasadyTerapiiFagowej.html>

Thung, T. Y., E. Lee, J. M. K. J. K. Premarathne, M. Nurzafirah, C. H. Kuan, N. Elexson, C. W. Tan, T. T. H. Malcolm, C. Y. New, O. S. B. Ramzi, N. J. Nuzul, A. M. Noor Azira, U. Z. A. Ungku Fatimah and R. Son (2018):

Bacteriophages and their applications.

Food Research, 2 (5), 404-414

Turner, K. H., J. Everett, U. Trivedi, K. P. Rumbaugh and M. Whiteley (2014):

Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* acute burn and chronic surgical wound infection.

PLoS Genet, 10, e1004518. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004518.

Vaitekenas, A., A. S. Tai, J. P. Ramsay, S. M. Stick and A. Kicic (2021):

*Pseudomonas aeruginosa* Resistance to Bacteriophages and Its Prevention by Strategic Therapeutic Cocktail Formulation.

Antibiotics (Basel), 10, 145. DOI: 10.3390/antibiotics10020145.

Valot, B., C. Guyeux, J. Y. Rolland, K. Mazouzi, X. Bertrand and D. Hocquet (2015):

What It Takes to Be a *Pseudomonas aeruginosa*? The Core Genome of the Opportunistic Pathogen Updated.

PLoS One, 10, e0126468. DOI: 10.1371/journal.pone.0126468.

van Loosdrecht, M. C., J. Lyklema, W. Norde and A. J. Zehnder (1990):

Influence of interfaces on microbial activity.

Microbiol Rev, 54, 75-87

Vogel, J. and W. J. Quax (2019):

Enzymatic Quorum Quenching in Biofilms.

In: Quorum Sensing: Molecular Mechanism and Biotechnological Application / Hrsg.: G.

Tommonaro, 1. Auflage, S. 173-193.

London: Academic Press, ISBN 978-0-12-814905-8

Wihlmann, L., G. Wagner, N. Cramer, B. Siebert, P. Gudowius, G. Morales, T. Kohler, C. van Delden, C. Weinel, P. Slickers and B. Tummeler (2007):

Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*.

Proc Natl Acad Sci U S A, 104, 8101-8106

Wingender, J. (2013):

*Pseudomonas aeruginosa* - Biofilme, Kultivierbarkeit und Kupferionen unter Berücksichtigung der Trinkwasser-Installation.

In: 10. Hygiene Forum Bonn / Hrsg.: Universität Duisburg-Essen

10. Hygiene Forum Bonn, Bonn 12. September 2013, Vortrag

Xie, Y., L. Wahab and J. J. Gill (2018):

Development and Validation of a Microtiter Plate-Based Assay for Determination of Bacteriophage Host Range and Virulence.

Viruses, 10, 189. DOI: 10.3390/v10040189.

Zhang, S., C. Ye, H. Lin, L. Lv and X. Yu (2015):

UV disinfection induces a VBNC state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Environ Sci Technol, 49, 1721-1728

Zhang, Y. and Z. Hu (2013):

Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine.

Biotechnol Bioeng, 110, 286-295



## Anhang

Tabelle 13: relevante Gene bei Phagenresistenz

Gen	Lokus <i>P. aeruginosa</i> PAO1/ <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344	codiert für	Resistenzbeteiligung beschrieben von
<i>algA</i>	PA3551	Mannose-1-phosphat-Guanylyltransferase/ Mannose-6-phosphat-Isomerase	Marko et al. *
<i>algC</i>	PA5322	Phosphomannomutase	Rocchetta et al. *
<i>cas6f</i>	BN5_RS21005	Typ I CRISPR-assoziierte Endoribonuklease	Vaitekenas et al. *
<i>csy1</i>	BN5_RS20990	Typ I-F CRISPR-assoziiertes Protein Csy1	Vaitekenas et al. *
<i>csy2</i>	BN5_RS20995	Typ I-F CRISPR-assoziiertes Protein Csy2	Vaitekenas et al. *
<i>csy3</i>	BN5_RS21000	Typ I-F CRISPR-assoziiertes Protein Csy3	Vaitekenas et al. *
<i>fimT</i>	PA4549	Typ 4 Fimbrienbiogeneseprotein FimT	Marko et al. *
<i>fimU</i>	PA4550	Typ 4 Fimbrienbiogeneseprotein FimU	Marko et al. *
<i>galU</i>	PA2023	UTP-Glucose-1-phosphat-Uridyltransferase	Vaitekenas et al.
<i>gmd</i>	PA5453	GDP-Mannose-4,6-dehydratase	Rocchetta et al. *
<i>hmgA</i>	PA2009	Homogentisat-1,2-dioxygenase	Le et al.
<i>mlgA</i>	PA0705	Alpha-1,6-rhamnosyltransferase MigA	Vaitekenas et al.
<i>pilA</i>	PA4525	Typ 4 Fimbrienprotein PilA	Marko et al. *
<i>pilE</i>	PA4556	Typ 4 Fimbrienbiogeneseprotein PilE	Marko et al. *
<i>pilJ</i>	PA0411	<i>twitching motility</i> -Protein PilJ	Vaitekenas et al.
<i>pilR</i>	PA4547	Zweikomponenten-Antwortregulator PilR	Vaitekenas et al.
<i>pilT</i>	PA0395	<i>twitching motility</i> -Protein PilT	Vaitekenas et al.
<i>pilV</i>	PA4551	Typ 4 Fimbrienbiogeneseprotein PilV	Marko et al. *
<i>pilW</i>	PA4552	Typ 4 Fimbrienbiogeneseprotein PilW	Marko et al. *
<i>pilX</i>	PA4553	Typ 4 Fimbrienbiogeneseprotein PilX	Marko et al. *
<i>pilY1</i>	PA4554	Typ 4 Fimbrienbiogeneseprotein PilY1	Marko et al. *
<i>rmd</i>	PA5454	Oxidoreduktase Rmd	Vaitekenas et al.

Tabelle 13: Fortsetzung

<i>rpoN</i>	PA4462	RNA-Polymerasefaktor sigma-54	Vaitekenas et al.
<i>waaC</i>	PA5011	Heptosyltransferase I	Rocchetta et al. *
<i>waaF</i>	PA5012	Heptosyltransferase II	Rocchetta et al. *
<i>wbpA</i>	PA3159	UDP-N-acetyl-d-glucosamin-6-Dehydrogenase	Rocchetta et al. *
<i>wbpB</i>	PA3158	UDP-N-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-Glucuronatoxidase	Rocchetta et al. *
<i>wbpD</i>	PA3156	UDP-2-acetamido-3-amino-2,3-dideoxy-D-Glucuronat-N-acetyltransferase	Rocchetta et al. *
<i>wbpE</i>	PA3155	UDP-2-acetamido-2-deoxy-3-oxo-D-Glucuronataminotransferase	Rocchetta et al. *
<i>wbpG</i>	PA3150	LPS-Biosyntheseprotein WbpG	Rocchetta et al. *
<i>wbpH</i>	PA3149	Glycosyltransferase WbpH	Rocchetta et al. *
<i>wbpI</i>	PA3148	UDP-2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-D-Glucuronate-2-epimerase	Rocchetta et al. *
<i>wbpJ</i>	PA3147	Glycosyltransferase WbpJ	Rocchetta et al. *
<i>wbpK</i>	PA3146	NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase	Rocchetta et al. *
<i>wbpL</i>	PA3145	Glycosyltransferase WbpL	Vaitekenas et al.
<i>wbpM</i>	PA3141	Nukleotid-Zuckerepimerase/Dehydratase WbpM	Rocchetta et al. *
<i>wbpW</i>	PA5452	Phosphomannose-Isomerase/Mannose-1-phosphate-Guanylyltransferase	Rocchetta et al. *
<i>wbpX</i>	PA5449	Glycosyltransferase WbpX	Rocchetta et al. *
<i>wbpZ</i>	PA5447	Glycosyltransferase WbpZ	Rocchetta et al. *
<i>wzm</i>	PA5451	LPS-Effluxtransporter-Membranprotein	Rocchetta et al. *
<i>wzt</i>	PA5450	ABC-Transporter	Rocchetta et al. *
<i>wzx</i>	PA3153	O-Antigen-Translokase	Rocchetta et al. *
<i>wzy</i>	PA3154	B-Band O-Antigen-Polymerase	Vaitekenas et al.
<i>wzz</i>	PA3160	O-Antigen Kettenlängenregulator	Rocchetta et al. *

\*: Eine Resistenz ist nicht beschrieben, aber vermutet, da die entsprechenden Gene für Polysaccharid-Antigene, Lipopolysaccharide, O-Antigene oder Typ IV Pili codieren bzw. am CRISPR/Cas-System beteiligt sind (Vaitekenas et al. 2021).

Anhang

Tabelle 14: Vorkommen der 44 Gene bei den *P. aeruginosa*-Wildstämmen

Gen	DSM 25641	ILH 02759	ILH 02678	ILH 02680	ILH 02763	ILH 02774	ILH 02778	ILH 02781
<i>algA</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>algC</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>cas6f</i>	nein	ja	nein	ja	nein	nein	ja	nein
<i>csy1</i>	nein	ja	nein	ja	nein	nein	ja	nein
<i>csy2</i>	nein	ja	nein	ja	nein	nein	ja	nein
<i>csy3</i>	nein	ja	nein	ja	nein	nein	ja	nein
<i>fimT</i>	ja	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>fimU</i>	ja	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>galU</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>gmd</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>hmgA</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>migA</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>pilA</i>	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
<i>pilE</i>	ja	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>pilJ</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>pilR</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>pilT</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>pilV</i>	ja	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>pilW</i>	ja	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>pilX</i>	ja	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>pilY1</i>	ja	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>rmd</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>rpoN</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>waaC</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>waaF</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>wbpA</i>	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
<i>wbpB</i>	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
<i>wbpD</i>	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
<i>wbpE</i>	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
<i>wbpG</i>	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
<i>wbpH</i>	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
<i>wbpI</i>	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
<i>wbpJ</i>	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
<i>wbpK</i>	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
<i>wbpL</i>	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
<i>wbpM</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>wbpW</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>wbpX</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>wbpZ</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>wzm</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>wzt</i>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>wzx</i>	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
<i>wzy</i>	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
<i>wzz</i>	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

## Publikationen

Perleth, J., Alter, T., Hammerl, J.A., Gölz, G. (2021 / Poster und Posterpitch):

Einsatz von Bakteriophagen gegen *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilme in der Lebensmittelkette.

61. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene und Verbraucherschutz der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 2021, Garmisch-Partenkirchen und online

Perleth, J., Alter, T., Orquera, S., Gölz, G., Jäckel, C., Schnehle, S., Hammerl, J.A. (2019 / Poster):

Genotypic and phenotypic characteristics of virulent phages for treatment of *P. aeruginosa* bacteria.

20. BfR-Forum Verbraucherschutz Bakteriophagen 2019, Berlin

Savin, M., Schnehle, S., Jäckel, C., Schmoger, S., Falenski, A. Käsbohrer, A., Perleth, J., Hammerl, J.A. (2019 / Poster):

Characterization of two temperate *P. aeruginosa* phages from process waters of a German poultry slaughterhouse.

20. BfR-Forum Verbraucherschutz Bakteriophagen 2019, Berlin

Perleth, J., Alter, T., Orquera, S., Gölz, G., Rohde, C., Rohde, M., Jäckel, C., Schnehle, S., Hammerl, J.A. (2019 / Poster):

vB\_Pae-CS2310 – Ein neuer Phage zur Bekämpfung von *Pseudomonas aeruginosa*?

60. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene und Verbraucherschutz der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 2019, Garmisch-Partenkirchen

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Thomas Alter dafür danken, dass ich am Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene in einer so angenehmen Arbeitsatmosphäre promovieren konnte. Vielen Dank, dass Du immer Zeit und ein offenes Ohr für mich hattest und mich durch all die unerwarteten Probleme durchmanövriert hast. Ich danke Dir für Dein Vertrauen und Deine Unterstützung.

Ein ganz besonders herzlicher Dank geht an Dr. Greta Gölz, die mir bei Fragen immer zur Seite stand. Vielen Dank für Deine unendliche Geduld, Deine Zeit und den motivierenden Input, die vielen Diskussionen und Denkanstöße. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Jens A. Hammerl vom BfR. Vielen Dank, dass Du mir so oft geduldig Deine Zeit geopfert hast, die Zusammenarbeit mit Dir hat mich immer wieder neu motiviert.

Dr. Stefanie Orquera danke ich für die Einarbeitung ins Labor und in das Themengebiet der Bakteriophagen.

Auch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelsicherheit und -hygiene möchte ich von Herzen für die fachliche und moralische Unterstützung danken, besonders Frau Christine Zilk und Frau Bettina Sahrada für die Herstellung der Nährmedien. Vielen Dank auch an Frau Dr. Vanessa Brückner für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die aufbauenden Worte und die Unterstützung zu jeder Zeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt der Unterstützung meiner Eltern Birgit und Christoph Perleth. Vielen Dank auch an meinen Bruder Jonathan Perleth, der mich immer wieder aufgebaut hat. Meinem Freund Jan Kanaan danke ich darüber hinaus, dass er mir seinen Schreibtisch zur Verfügung gestellt hat, an dem große Teile dieser Arbeit entstanden sind. Danke Euch allen für den Zuspruch und das Vertrauen in mich.

## **Interessenskonflikte - Conflict of Interest**

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Berlin, den 17.05.2022

J. Perleth













9 783967 291650

**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-165-0